

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie
und -Embryologie des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR LOKALISATION VON
ALKALISCHER PHOSPHATASE- UND 5'-NUKLEOTIDASE-
AKTIVITÄT IN DER WEISSEN MILZPULPA DES SCHWEINES**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christine Rühl

Tierärztin aus Berlin

Berlin 1983

Journal Nr. 1125



Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie
und -Embryologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR LOKALISATION VON ALKALISCHER PHOSPHATASE- UND
5'-NUKLEOTIDASE-AKTIVITÄT IN DER WEIßEN MILZPULPA
DES SCHWEINES

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christine Rühl
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1983
Journal-Nr. 1125

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner

Referent: Prof. Dr. J. Schlüns

Korreferent: Prof. Dr. H. Loppnow

Tag der Promotion: 28. April 1983

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	7
2. Material und Methodik	13
2.1 Material	13
2.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen an Paraffinschnitten	13
2.3 Elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung	13
2.4 Lichtmikroskopische Darstellung der alkalischen Phosphatase-Aktivität	15
2.4.1 Azofarbstoffmethode nach STUTTE	16
2.4.2 Direkte Bleisalzmethode nach HUGON und BORGERS	17
2.4.3 Direkte Bleisalzmethode nach MAYAHARA et al.	18
2.4.4 Direkte Bleisalzmethode nach TRANZER	18
2.4.5 Direkte Bleisalzmethode nach MIZUTANI	18
2.4.6 Indirekte Bleisalzmethode nach GOMORI	19
2.4.7 Spezifitätskontrollen	19
2.5 Elektronenmikroskopische Darstellung der alkalischen Phosphatase-Aktivität	20
2.6 Lichtmikroskopische Darstellung der 5'-Nukleotidase-Aktivität	23
2.6.1 Nachweis nach WACHSTEIN und MEISEL	23
2.6.2 Nachweis nach YAMASHINA und KAWAI	23
2.6.3 Nachweis nach UUSITALO und KARNOVSKY	24
2.6.4 Nachweis nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER	24
2.6.5 Nachweis nach BARRON und BOSHERS	24
2.6.6 Spezifitätskontrollen	25

2.7	Elektronenmikroskopische Darstellung der 5'-Nukleotidase-Aktivität	25
2.8	Doppelinkubation	27
2.9	Darstellung der IgM-tragenden Lymphozyten nach GUTMAN und WEISSMAN und der 5'-Nukleotidase-Aktivität nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER am selben Schnitt	27
3.	Befunde	29
3.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen an Paraffin- und Semidünnschnitten	29
3.1.1	Hämalaun-Erythrosin-Färbung	29
3.1.2	Färbung von Kunststoffsemidünnschnitten mit LÖFFLER's Methylenblau und STEVENEL's Blau	31
3.1.3	Färbung nach PASINI	34
3.1.4	PAS-Reaktion	35
3.1.5	Färbung nach PUCHTLER et al.	35
3.2	Lichtmikroskopisch-enzymhistochemische Untersuchungen	36
3.2.1	Lichtmikroskopische Untersuchung der alkalischen Phosphatase-Aktivität	37
3.2.1.1	Azofarbstoffnachweis nach STUTTE	37
3.2.1.2	Nachweis nach HUGON und BORGERS	39
3.2.1.3	Nachweis nach MAYAHARA et al.	41
3.2.1.4	Nachweis nach TRANZER	41
3.2.1.5	Nachweis nach MIZUTANI	41
3.2.1.6	Nachweis nach GOMORI	42
3.2.2	Lichtmikroskopische Untersuchung der 5'-Nukleotidase-Aktivität	43

	<u>Seite</u>
3.2.2.1 Nachweis nach WACHSTEIN und MEISEL	43
3.2.2.2 Nachweis nach YAMASHINA und KAWAI	44
3.2.2.3 Nachweis nach UUSITALO und KARNOVSKY	45
3.2.2.4 Nachweis nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER	45
3.2.2.5 Nachweis nach BARRON und BOSHER	46
3.2.3 Doppelinkubation: alkalische Phosphatase nach STUTTE; 5'-Nukleotidase nach NOVI- KOFF und GOLDFISCHER	47
3.3 Ultrahistochemische Untersuchung der alkalischen Phosphatase-Aktivität	48
3.4 Ultrahistochemische Untersuchung der 5'-Nukleotidase-Aktivität	49
3.5 Elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung	51
3.6 Darstellung IgM-tragender Lymphozyten nach GUTMAN und WEISSMAN und 5'-Nukleotidase nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER am selben Schnitt	61
4. Diskussion	63
5. Zusammenfassung	103
6. Abbildungen	105
7. Literaturverzeichnis	134



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung:

Die weiße Pulpa der Milz besteht aus lymphoretikulärem Gewebe, in welchem drei funktionelle Kompartimente unterschieden werden können: die periarteriolen lymphatischen Scheiden (PALS), die Follikel und die Marginalzonen.

Während die Innenzone der PALS mit thymusabhängigen T-Lymphozyten besiedelt ist, kann in den Primärfollikeln eine B-Lymphozytenpopulation nachgewiesen werden. Dagegen treten in den Marginalzonen und in den Sekundärfollikeln sowohl B- als auch T-Lymphozyten auf (STEIN et al. 1980). Eine gleiche Besiedlung liegt auch in der peripheren PALS vor (VAN EWIOK et al. 1977).

Da es sich bei der Milz um ein peripheres lymphoretikuläres Organ handelt, findet im Verlauf der Ontogenese erst sekundär eine Besiedlung mit B- bzw. T-Lymphozyten statt, die sich in gesetzmäßiger Weise in die ihnen zugehörigen Kompartimente einlagern (EICKELENBOOM et al. 1979). Die charakteristische Besiedlung der Kompartimente ist sowohl über die spezifischen Oberflächenantigene der Lymphozyten als auch durch experimentelle Depopulation und Wiederbesiedlung mit markierten Zellen bekannten Ursprungs bewiesen worden (VAN EWIOK et al. 1974).

Die T- und B-Lymphozyten wandern jedoch nicht nur während der Erstbesiedlung der weißen Milzpulpa ein, sondern sie besitzen auch die Fähigkeit, die ihnen zugehörigen Gebiete zu verlassen, um nach einer Verweilzeit im Blutkreislauf wieder in sie zurückzukehren (Übersicht bei FORD 1975), ein Vorgang, der als Rezirkulation bezeichnet wird. Die Freisetzung von Lymphozyten aus der isolierten und in vitro perfundierten Schweinemilz, sowie die als "homing" bezeichnete Rückkehr in ihre spezifischen Kompartimente werden von PABST und TREPEL (1975) beschrieben. Danach ist, zumindest beim Schwein, die Milz das für die Lymphozytenrezirkulation wichtigste Organ.



Bei Ratte und Maus durchqueren die T- und B-Lymphozyten die Marginalzone in Kanälen, welche durch argyrophile Fasern begrenzt sind, die parallel zur Wanderungsrichtung der Lymphozyten zwischen weißer und roter Pulpa verkehren (MITCHELL 1973). Wandernde Lymphozyten finden sich auch in der peripheren PALS (VAN EWICK und VAN DER KWAAT 1980).

Für dieses auch als Ökotaxis bezeichnete Phänomen der Rückwanderung von Lymphozyten (DE SOUSA 1971) ist bisher ungeklärt, durch welche Mechanismen die Lymphozyten ihre spezifischen Kompartimente auffinden. Es läßt sich jedoch ein Einfluß ihrer Glykokalix feststellen, da Neuraminidasebehandlung das Wanderungsverhalten von T-Lymphozyten verändert (BERNEY und GESNER 1970).

Nach MÜLLER-HERMELINK et al. (1974) könnten sich die Lymphozyten an Leitstrukturen orientieren, deren morphologisches Substrat sie in den fixen gerüstbildenden Zellen des lymphoretikulären Gewebes vermuten. Nach dem Vorschlag von MÜLLER-HERMELINK und LENNERT (1978) werden diese Zellen unter dem Oberbegriff "Retikulumzellen" zusammengefaßt und die folgenden Formen unterschieden: histiozytäre, fibroblastische, dendritische und interdigitierende Retikulumzellen.

Die histiozytären Retikulumzellen finden sich in allen drei Kompartimenten der weißen Milzpulpa (MÜLLER-HERMELINK und LENNERT 1978). Dagegen sind die interdigitierenden Retikulumzellen (IDZ) auf das T-Zellgebiet der zentralen PALS beschränkt, während die dendritischen Retikulumzellen (DRZ) im Keimzentrum der Sekundärfollikel vorkommen. Fibroblastische Retikulumzellen (FRZ) können in allen Kompartimenten der weißen Milzpulpa auftreten, wobei es allerdings tierartliche Unterschiede gibt.

Nach MÜLLER-HERMELINK (1974) und MÜLLER-HERMELINK et al. (1976) bauen die für die T- bzw. B-zellabhängigen Gebiete typischen Retikulumzellen ein spezifisches Mikromilieu auf, welches für die charakteristische Besiedlung

der weißen Pulpa durch die lymphatischen Zellen verantwortlich ist. Beeinflußt werden soll das Mikromilieu durch Ektoenzyme dieser Retikulumzellen, die von der Arbeitsgruppe um LENNERT am Beispiel des Menschen eingehend untersucht wurden: Danach besitzen die zellmembranständigen Enzyme 5'-Nukleotidase (5'-Nase), alkalische Phosphatase sowie Mg^{2+} -Adenosintriphosphatase (ATPase) ein charakteristisches Verteilungsmuster, welches mit den T- bzw. B-zellabhängigen Gebieten korreliert ist. Zumindest teilweise sind diese Enzymaktivitäten an den Retikulumzellen dieser Kompartimente lokalisiert und werden deshalb von den Autoren dieser Gruppe als Leitenzyme für die Kompartimente der weißen Milzpulpa benutzt (LENNERT und LÖFFLER 1962; MÜLLER-HERMELINK 1974; MÜLLER-HERMELINK et al. 1976).

Während sich die Arbeit von LENNERT und LÖFFLER (1962) auf die Lichtmikroskopie beschränkt, wird in den beiden anderen Arbeiten die Enzymaktivität auf elektronenmikroskopischer Ebene bestimmten Zellgruppen zugeordnet:

Die 5'-Nase ist nach MÜLLER-HERMELINK et al. (1974) an den DRZ des Keimzentrums lokalisiert. Schwächere Aktivität tragen die Mantellymphozyten der Sekundärfollikel und die Lymphozyten der Marginalzone.

Biochemisch läßt sich auch an menschlichen Lymphozyten des Blutes und der peripheren lymphatischen Organe 5'-Nase-Aktivität messen (EDWARDS et al. 1979). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von UUSITALO und KARNOVSKY (1977 a), die in der weißen Milzpulpa der Maus T- und B-Zellsubpopulationen mit 5'-Nase-Aktivität beschreiben.

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität erbringt Reaktionsprodukt an netzartigen Strukturen in der Marginalzone sowie exzentrisch im Bereich der PALS. Dieses Reaktionsprodukt wird Lymphozyten und Retikulumzellen zugeordnet. ATPase-Aktivität ist im Lymphozytenmantel der Keimzentren und an Zellen der Marginalzone vorhanden (MÜLLER-HERMELINK et al. 1974).

Von diesem, beim Menschen gefundenen Verteilungsmuster weicht das Verhalten der Enzyme bezüglich ihrer Lokalisation bei den bisher untersuchten Tierarten zum Teil erheblich ab.

Aus Untersuchungen der Rattenmilz ist bekannt, daß in der PALS ein Netz ortsgebundener 5'-Nase-positiver Retikulumzellen vorkommt; daneben wird Aktivität an Zellen im Grenzgebiet zwischen weißer Pulpa und Marginalzone angetroffen. Ferner tritt 5'-Nase-Aktivität an einigen Zellen innerhalb der Follikel auf (CATAYÉE et al. 1973; 1975).

Alkalische Phosphatase kann in der weißen Pulpa nicht nachgewiesen werden, sie ist nur an Gefäßendothelien lokalisiert (CATAYÉE und CHALET 1979). In den Keimzentren zeigt sich ein ATPase-positives Netz, welches den DRZ zugeordnet wird (EICKELNBOOM 1978).

Bei der Maus findet sich alkalische Phosphatase-Aktivität an der Peripherie der weißen Pulpa an der Grenze zur Marginalzone. 5'-Nase kommt bei dieser Spezies, ebenso wie bei Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen, an den Retikulumzellen der PALS vor (CATAYÉE et al. 1973).

Mit der Verteilung der alkalischen Phosphatase-Aktivität im lymphatischen Gewebe verschiedener Spezies beschäftigt sich die Arbeit von KOUVALAINEN (1971). Seine Untersuchung der Milzen von Katze, Hund, Rind, Kaninchen, Schaf und Ratte führt zu dem Ergebnis, daß artabhängig starke Unterschiede in Verteilung und Aktivität dieses Enzyms bestehen. Besonders charakteristische Verteilungsmuster finden sich bei Rind, Katze und Kaninchen. Während die Follikel der Katzenmilz nur schwache Enzymaktivität aufweisen, zeigen die von Rind und Kaninchen stark positive Reaktion. Eine Zuordnung zu definierten Strukturen wird in dieser Arbeit nicht vorgenommen.

HEUSERMANN et al. beschreiben die alkalische Phosphatase-Aktivität in der weißen Milzpulpa des Kaninchens. Das Enzym ist hier an den FRZ der T- und B-zellabhängigen Gebiete lokalisiert.

Die Verteilung der Enzymaktivitäten von alkalischer Phosphatase, 5'-Nase und ATPase in der weißen Milzpulpa des Schweines wird von BADER (1981) beschrieben. Danach besitzt das Schwein ein Verteilungsmuster, welches dem des Menschen entgegengesetzt ist und sich teilweise mit dem bei Ratte und Maus gefundenen deckt. Auch hier besteht eine gute Übereinstimmung mit den T- bzw. B-zellabhängigen Gebieten.

Die licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung der ATPase-Aktivität ergibt eine Lokalisation des Enzyms an FRZ der PALS sowie an konzentrisch um den Follikel angeordneten FRZ, die die Grenze zur Marginalzone bilden. Starke ATPase-Aktivität besitzen auch die DRZ der Sekundärfollikel.

Lichtmikroskopisch stellt BADER (1981) fest, daß die Verteilung der 5'-Nase-Aktivität im Bereich der PALS mit dem ATPase-positiven Netz der FRZ übereinzustimmen scheint. An der Peripherie der Follikel zeigen die 5'-Nase-positiven Strukturen dagegen keine Deckung mit den ATPase-positiven Retikulumzellen, die hier weiter außen liegen. Das 5'-Nase-positive Netz der PALS scheint sich jedoch kontinuierlich in die Zone der 5'-Nase-Aktivität an der Follikelperipherie fortzusetzen. Die Natur dieses enzymaktiven Netzes ist jedoch wegen des begrenzten Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops nicht aufgeklärt worden.

Die alkalische Phosphatase-Aktivität ist lichtoptisch im Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel - zentral der 5'-Nase-positiven Zone - mit einem rundmaschigen Netzwerk assoziiert. Dieses Netz kann lichtmikroskopisch ebenfalls nicht eindeutig zu bestimmten Strukturen in Beziehung gesetzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, zunächst die Aktivitätsmuster der alkalischen Phosphatase und 5'-Nase ultrahistochemisch definierten Strukturen zuzuordnen und diese an-

schließlich feinstrukturell zu analysieren.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen dazu beitragen, die Beziehungen zwischen den Aktivitätsmustern und den Kompartimenten der weißen Pulpa besser zu verstehen.

Die zu untersuchenden Enzyme kommen in der weißen Milzpulpa des Schweines nur in geringen Aktivitäten vor. Die Anpassung der ultrahistochemischen Nachweistechiken an diese Bedingungen stellt deshalb ein zunächst zu lösendes Problem dieser Arbeit dar.

2. Material und Methodik

2.1 Material

Als Untersuchungsmaterial dienten Schweinemilzen, die unmittelbar nach der Schlachtung aus Schlachtschweinen des Schlachthofes Berlin Spandau entnommen wurden. Es handelte sich dabei um Tiere der deutschen Landrasse mit einem Lebendgewicht von ca. 100 kg, die auf Grund von Lebend- und Fleischschau als klinisch gesund galten. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet.

2.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen an Paraffinschnitten
Milzblöcke von 3-4 cm Kantenlänge und 3 cm Dicke wurden in Methacarn nach PUCHTLER et al. (1970) für 24 Std. bei 0-4 °C fixiert. Die Entwässerung und Einbettung in Paraffin erfolgte nach den Angaben von PUCHTLER et al. (1970). 5 µm dicke Schnitte wurden aufgezogen und folgenden Nachweisen bzw. Färbungen unterworfen:

Hämalaun-Erythrosin (ROMEIS 1968);
Trichromfärbung nach PASINI (ROMEIS 1968);
PAS-Reaktion (BARKA und ANDERSON 1963);
Levanol-Echt-Cyanin 5 RN (PUCHTLER et al. 1974).

Die Schnitte wurden mit Eukitt eingeschlossen.

2.3 Elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung

Zur Fixierung wurden die Milzen zur Hälfte abgeklemmt und nur der dorsale Teil zur Perfusion verwendet. Diese erfolgte über die parallel zum Hilus verlaufende A. lienalis. Zunächst wurden 80-100 ml Spülpuffer von 0-4 °C injiziert, gefolgt von 80-100 ml Fixierungslösung, ebenfalls bei 0-4 °C.

Die Milz wird meist ungleichmäßig von der Fixierung durchdrungen. Gut perfundierte Bezirke markieren sich durch kräftig hellrote Färbung. Aus ihnen wurden Gewebestreifen von ca. 1 mm Dicke entnommen. Sie wurden anschließend

im Eisbad im gleichen Fixans immersionsfixiert; die Dauer der Immersionsfixierung betrug 2 Std.. Im Anschluß an die Fixierung wurden die Präparate wieder in Spülpuffer von 0-4 °C gebracht, der nach einer Stunde und dann nach weiteren zwei Stunden gewechselt wurde. Die Blöcke wurden bis zum nächsten Tag in Spülpuffer aufbewahrt.

Zur anschließenden Osmierung wurden Blöckchen von 1 mm Kantenlänge hergestellt und 2 Std. im Kühlschrank in einer Mischung von 1 Teil OsO_4 (2 %ig in H_2O) und 1 Teil Spülpuffer behandelt. Dann wurden die Blöcke in 0,05 M Natrium-Maleatpuffer von pH 5,2 bei 0-4 °C verbracht. Der Puffer wurde 3 mal im Abstand von 5 min gewechselt. Danach erfolgte die Blockkontrastierung nach KARNOVSKY (1967) in Uranylacetat für 2 Std. bei 0-4 °C. Das Uranylacetat wurde 3 mal 5 min in Natrium-Maleatpuffer wie oben bei 0-4 °C ausgewaschen. Die Entwässerung der Blöcke und die Einbettung in Polarbed wurden nach den Angaben der Lieferfirma (Dr. Walter HERT) durchgeführt.

Zusammensetzung des Spülpuffers:

Natriumcacodylat (Dimethylarsinsäure, Dinatriumsalz) 0,1 M
Saccharose 4 %, pH 7,4, 325 m Osmol;
dieser Puffer wurde auch mit 5 % Saccharose benutzt, entsprechend 340 m Osmol. Dabei ergab sich kein Unterschied in der Gewebeerhaltung.

Zusammensetzung der Fixierungslösung

Glutaraldehyd, redestilliert 4 %, Natriumcacodylat 0,1 M, pH 7,2; 560 m Osmol.

Alle Angaben beziehen sich auf Endkonzentrationen in den gebrauchsfertig angesetzten Lösungen. Die Osmolalität wurde mit einem Halbmikro-Osmometer der Firma KNAUER bestimmt. Der pH-Wert der Lösungen wurde an der Glaselektrode kontrolliert und, soweit erforderlich, mit 1N NaOH oder mit 1N HCl korrigiert.

Von den in Kunststoff eingebetteten Blöckchen wurden 2 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt und zu Übersichtszwecken mit LÖFFLER's Methyleneblau 3-5 min bei 80 °C gefärbt. Nach Spülung in Aq. bidest. und Lufttrocknung wurden sie mit Eukitt eingedeckt.

Die Ultradünnschnitte wurden auf einem REICHERT Ultramikrotom Om U 2 hergestellt. Sie wurden auf unbefilmte Ringblenden aufgezogen und entweder ohne zusätzliche Nachkontrastierung oder nachkontrastiert mit einer 1 %igen wässrigen Lösung von Phosphorwolframsäure für 1 Std in der feuchten Kammer (WATSON 1958) mit dem SIEMENS Elektronenmikroskop 1 A untersucht.

Nach dem Ultradünnschneiden wurden teilweise nochmals 0,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, die 2 min bei 80 °C mit LÖFFLER's Methyleneblau und 10 sec mit 1 %igem wässrigem Safranin gefärbt wurden.

Gesondert wurden auch 2 µm dicke Semidünnschnitte mit STEVENEL's Blau nach den Angaben von DEL CERRO et al. (1980) angefärbt, die nach Spülung in Aq. bidest. und Lufttrocknung mit Eukitt eingedeckt wurden.

2.4 Lichtmikroskopische Darstellung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an Kryostat-schnitten von nativem und fixiertem Gewebe der Schweinemilz durchgeführt.

Sofort nach der Entnahme des Organs auf dem Schlachthof wurden Blöckchen von 0,5 cm Kantenlänge und 0,5 cm Dicke geschnitten, in Aluminiumfolie gewickelt und in flüssigen Stickstoff verbracht.

Die Präparate wurden im Labor mit flüssigem CO₂ auf Kryostatstische montiert und davon 10 µm dicke Schnitte hergestellt (Kryostatsystem DITTES-DUSPIVA). Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Ein Teil der Schnitte wurde ohne Nach-

fixierung zum Enzymnachweis verwendet.

Weitere Schnitte wurden für 10 min bei 0-4 °C in Formol-Calcium (4 % säurefreies Formol mit 1 % CaCl_2 , PEARSE 1980) nachfixiert und anschließend 2 mal 2 min in 0,15 M NaCl bei Zimmertemperatur gespült.

Kryostatschnitte des für den ultrahistochemischen Nachweis perfundierten Gewebes wurden in 0,15 M NaCl aufgefangen und anschließend freischwimmend inkubiert.

Folgende histochemische Nachweise der alkalischen Phosphatase kamen zur Anwendung:

Azofarbstoffmethode nach STUTTE (1967);

Direkte Bleisalzmethode ohne zusätzliche Komplexbildner nach HUGON und BORGERS (1966).

Direkte Bleisalzmethoden mit zusätzlichen Komplexbildnern nach MAYAHARA et al. (1967);

nach TRANZER (1966);

nach MIZUTANI (1966).

Zweistufige Bleisalzmethode nach GOMORI (1952).

Alle folgenden Konzentrationsangaben beziehen sich auf Endkonzentrationen in den gebrauchsfertig angesetzten Inkubationsmedien.

2.4.1 Azofarbstoffmethode nach STUTTE (1967)

Substrat: Naphthol-AS-BI-phosphat 0,55 μM

Puffer: Tris-HCl-Puffer pH 9.0 0,2 M

Hexazotiertes Neufuchsin 0,27 mM

Dimethylformamid 0,07 M

End-pH 8,6-9,0

Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C, die Inkubationszeiten wurden nach Kontrollen unter dem Färbemikroskop bestimmt. Sie lagen für native Schnitte bei 20-30 min, für Schnitte des perfusionsfixierten Materials bei 60 min. Anschließend erfolgte die Spülung 2 mal 2 min in 0,15 M

NaCl; Eindecken mit Glyceringelatine nach KAISER (RO-MEIS 1968).

2.4.2 Direkte Bleisalzmethode nach HUGON und BORGERS (1966)

Dieser Nachweis wurde in zwei Modifikationen mit unterschiedlichem End-pH (GEYER 1973) durchgeführt.

Substrat: Glycerin-2-phosphat, Dinatriumsalz	8,2 mM
Puffer: Tris-Maleatpuffer pH 8,2	20 mM
Bleinitrat	3,9 mM
Saccharose	0,22 M

oder

Substrat: Glycerin-2-phosphat, Dinatriumsalz	8,2 mM
Puffer: Tris-Maleatpuffer pH 9,0	40 mM
Bleinitrat	3,9 mM
Saccharose	0,22 M

In einigen Fällen wurde diesem Ansatz $MgCl_2$ in einer Endkonzentration von 2-4 mM als Aktivator zugesetzt.

Um die Bildung lästiger Bleiniederschläge zu vermindern, wurden die Medien 15 min bei 37 °C präinkubiert, anschließend 60 min bei Zimmertemperatur belassen und danach sofort benutzt. Zur Herstellung der Medien wurde stets frisch destilliertes und kurz vor Gebrauch abgekochtes Wasser verwendet.

Die Inkubationsdauer für native Schnitte betrug 30 min, für Schnitte des perfusionsfixierten Materials 60 min bei 37 °C mit beiden Inkubationsmedien.

Nachbehandlung: Die Schnitte wurden 3 mal 5 min in 0,15 M NaCl gespült, für 2 min in verdünntes Ammoniumsulfid eingestellt und anschließend 3 mal 5 min in 0,15 M NaCl gespült. Die Schnitte wurden mit Glyceringelatine nach KAISER eingedeckt.

2.4.3 Direkte Bleisalzmethode nach MAYAHARA et al. (1967)

Substrat: Glycerin-2-phosphat, Dinatriumsalz	20	mM
Tris-HCl-Puffer pH 8,5	28	mM
Magnesiumsulfat	3,9	mM
Saccharose	0,22	M

10 ml dieses Mediums enthielten 4 ml einer gesättigten Bleicitratlösung von pH 10,0.

Der End-pH wurde auf 9,2 - 9,4 eingestellt.

Die Inkubationszeit betrug für native Schnitte 30 min, für Schnitte des perfusionsfixierten Materials 60 min, jeweils bei 37 °C.

Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben.

2.4.4 Direkte Bleisalzmethode nach TRANZER (1966)

Substrat: Glycerin-2-phosphat, Dinatriumsalz	0,4	mM
Puffer: Diäthylbarbitursäure, Natriumsalz	0,11	M
Trinatriumcitrat	12,3	mM
Bleinitrat	12,3	mM

End-pH 9,0 - 9,2

Inkubation der nativen Kryostatschnitte 60 min bei 37 °C.

Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben.

2.4.5 Direkte Bleisalzmethode nach MIZUTANI (1966)

Substrat: Glycerin-2-phosphat, Dinatriumsalz	8,5	mM
Puffer: 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol-Puffer pH 9,4	94,7	mM
Kalium-Natrium-Tartrat	18,6	mM
Bleinitrat	4,13	mM

End-pH 9,0

Inkubation der Schnitte von nativem und perfusionsfixiertem Material 60 min bei 37 °C.

Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben.

2.4.6 Indirekte Bleisalzmethode nach GOMORI (1952)

Substrat: Glycerin-2-phosphat, Dinatriumsalz 16,3 mM
Puffer: 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol-Puffer
pH 9,4 0,1 M
Calciumchlorid 5 mM
Magnesiumchlorid 2,4 mM
End-pH 9,0 - 9,2

Inkubationsdauer: 2 Std. für Schnitte des perfusions-
fixierten Materials.

Nachbehandlung: 1 min Spülung in 1 %igem Calciumchlorid,
5 min Spülung in 2 %igem Kobaltchlorid,
4 mal 25 sec Spülung in Aq. bidest.

Weitere Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen
Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben.

2.4.7 Spezifitätskontrollen:

1. Als spezifischer Hemmstoff der alkalischen Phosphatase wurde L-p-Bromtetramisol in einer Endkonzentration von 0,1 mM den Medien zugesetzt.
Als Kontrolle dienten Parallelinkubationen mit D-p-Bromtetramisol in gleicher Endkonzentration.
2. Kontrolle in substratfreiem Medium.
3. Inkubation mit 0,01 M Cystein im Medium.
4. Präinkubation der Schnitte in 6,25 %igem Glutaraldehyd 60 min bei 60 °C.

2.5 Elektronenmikroskopische Darstellung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Die Gewinnung der Präparate für die enzymhistochemisch-elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte wie schon für die Materialgewinnung zur elektronenmikroskopisch-histologischen Untersuchung beschrieben.

Der verwendete Spülpuffer entsprach in Menge und Zusammensetzung dem bereits in diesem Teil verwendeten Puffer.

Die eisgekühlt benutzte Fixierung war wie folgt zusammengesetzt:

Glutaraldehyd, redestilliert 0,1 %

Formaldehyd, aus Paraformaldehyd frisch depolymerisiert 4 %

Natriumcacodylat 0,1 M

End-pH 7,2 ; ca. 1700 m Osmol .

Nach Perfusion des Organs mit 80-100 ml Spülpuffer erfolgte die Fixierung durch Injektion von 80-100 ml Fixierungsflüssigkeit.

Streichholzstarke Gewebestreifen wurden aus gut perfundierten Organbezirken herausgeschnitten und für 2 Std. bei 0-4 °C in dem gleichen Fixans immersionsfixiert.

Die Nachspülung der Präparate wurde so, wie bei der elektronenmikroskopisch-histologischen Technik beschrieben, durchgeführt.

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität erfolgte an 50 µm dicken "Tissue Sectioner"-Schnitten. Hierzu wurden die Gewebestreifen mit 4 %igem Agar auf Filtrierpapier befestigt und für 5 min in den Kühlschrank gebracht. Mit dem SMITH-FARQUHAR Tissue Sectioner wurden die Dickschnitte von dem so vorbereiteten Gewebe hergestellt, die in Spülpuffer von 0-4 °C aufgefangen wurden.

Für den Enzymnachweis wurde das bereits bei den lichtmikroskopischen Nachweisen beschriebene Medium nach HUGON und BORGERS (1966) mit einem End-pH von 9,0 benutzt.

Für die elektronenmikroskopischen Nachweise kam das Medium jedoch sofort nach dem Ansetzen ohne Präinkubation zur

Anwendung. Es wurde 60 min bei 37 °C inkubiert.

Nachbehandlung: Spülung in Spülpuffer bei 0-4 °C, 3 mal 5 min. Die Osmierung, Blockkontrastierung, Entwässerung und Einbettung wurden, wie für die elektronenmikroskopisch-histologischen Untersuchungen angegeben, durchgeführt.

Da dieses Inkubationsmedium sehr rasch instabil werden kann, und häufig schon während der ersten zehn Minuten der Inkubation feinflockige Präzipitate entstehen, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigt, wurde das Medium wie folgt abgewandelt:

Substrat: Glycerin-2-phosphat, Dinatriumsalz	8,2 mM
Puffer: Tris-Maleat-Puffer	20 mM
Bleinitrat	3,9 mM
Gelatine	0,77 %
End-pH	8,2

Der Puffer sowie die verwendete Bleinitratlösung wurden mit frisch destilliertem und anschließend abgekochtem Wasser zubereitet. Das Substrat wurde ebenfalls in einer mit frisch destilliertem und abgekochtem Wasser zubereiteten Gelatinelösung gelöst. Das komplette Medium wurde zweimal filtriert und sofort benutzt.

Die Inkubationsdauer betrug 60 min bei 37 °C.

Nachbehandlung: 2 mal 5 min Spülung in Spülpuffer,
2 mal 5 min Spülung in s-Collidinpuffer
nach BENNETT und LUFT (1959), pH 7,4 bei
0-4 °C.

Zur Osmierung der Präparate wurden 2 Teile wässrige OsO₄-Lösung mit 1 Teil s-Collidinpuffer gemischt, wie bei KNYIHAR-CSILLIK und CSILLIK (1981) angegeben. Nach zweistündiger Osmierung bei 0-4 °C wurde 3 mal 5 min mit 0,2 M s-Collidinpuffer pH 7,4 bei 0-4 °C nachgespült.

Das Material wurde, abweichend von dem Vorgehen des für die elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung beschriebenen Einbettungsverfahrens, nicht mit Uranylacetat

nach KARNOVSKY (1967) blockkontrastiert, sondern direkt entwässert und in Polarbed eingebettet, wie bereits beschrieben für die elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung.

Zur lichtmikroskopischen Kontrolle der elektronenmikroskopischen Nachweise wurden in denselben Inkubationsmedien sowohl native, 20 μ m dicke Kryostatschnitte von den entsprechenden Milzen, als auch fixierte, 20 μ m dicke Kryostatschnitte von den Blöckchen, die zur Herstellung der Dickschnitte gedient hatten, mitgeführt.

Von den in Kunststoff eingebetteten Blöckchen wurden zu Übersichtszwecken 2 μ m dicke Semidünnschnitte angefertigt, die wie für die elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung mit LÖFFLER's Methylenblau angefärbt und mit Eukitt eingedeckt wurden.

Zusätzlich wurden 2 μ m dicke Semidünnschnitte mit verdünntem Ammoniumsulfid 2 min behandelt und anschließend 2 mal 2 min in 0,15 M NaCl gespült. Diese Schnitte wurden mit Glyceringelatine nach KAISER eingedeckt.

2.6 Lichtmikroskopische Darstellung der 5'-Nukleotidase-Aktivität

Die lichtmikroskopische Untersuchung der 5'-Nase-Aktivität wurde, wie schon für den lichtmikroskopischen Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität beschrieben, an Kryostatschnitten von nativem und für die Elektronenmikroskopie perfusionsfixiertem Material vorgenommen. Es wurden in allen Fällen direkte Bleisalzmethoden herangezogen:

Nachweis nach WACHSTEIN und MEISEL (1957);
Nachweis nach YAMASHINA und KAWAI (1981);
Nachweis nach UUSITALO und KARNOVSKY (1977 b);
Nachweis nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1961);
Nachweis nach BARRON und BOSHER (1961).

2.6.1 Nachweis nach WACHSTEIN und MEISEL (1957)

Substrat: Adenosin-5'-monophosphat, Dinatriumsalz	0,83 mM
Puffer: Tris-Maleat-Puffer pH 7,2	80 mM
Magnesiumnitrat	10 mM
Bleinitrat	3,6 mM
End-pH 7,2	

Inkubationszeit für natives Material 45 min, für perfusionsfixiertes Material 60 min bei 37 °C.

Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben.

2.6.2 Nachweis nach YAMASHINA und KAWAI (1981)

Substrat: Adenosin-5'-monophosphat, Dinatriumsalz	1,4 mM
Puffer: Natriumcacodylat-Puffer pH 7,2	0,1 M
Magnesiumsulfat	1,4 mM
Bleinitrat	1,8 mM

unter Zusatz von 5 % Saccharose, End-pH 7,2

Inkubationsdauer für Kryostatschnitte des perfusionsfixierten Materials 60 min bei 37 °C.

Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen Phos-

phatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben.

2.6.3 Nachweis nach UUSITALO und KARNOVSKY (1977 b)

Substrat: Adenosin-5'-monophosphat, Dinatriumsalz	1,4 mM
Puffer: Tris-Maleat-Puffer pH 7,2	0,1 M
Magnesiumsulfat	10 mM
Bleinitrat	1,8 mM

unter Zusatz von 5 % Saccharose, End-pH 7,2

Inkubationsdauer 45 min für natives Material, 60 min für perfusionsfixiertes Material bei einer Temperatur von 37 °C.

Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben.

2.6.4 Nachweis nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1961)

Substrat: Adenosin-5'-monophosphat, Dinatriumsalz	3,1 mM
Puffer: Tris-Maleat-Puffer pH 7,2	80 mM
Bleinitrat	2,4 mM
Manganchlorid	10 mM
End-pH 7,2	

Inkubationszeit für natives Material 45 min, für perfusionsfixiertes Material 60 min bei 37 °C.

Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben.

2.6.5 Nachweis nach BARRON und BOSHERS (1961)

Substrat: Adenosin-5'-monophosphat, Dinatriumsalz	0,8 mM
Puffer: Tris-Maleat-Puffer pH 7,2	0,05 M
Bleinitrat	3,6 mM
Manganchlorid	10 mM
End-pH 7,2	

Inkubationszeit für natives Material 60 min bei 37 °C.

Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben.

2.6.6 Spezifitätskontrollen

1. Als Substrat wurde den Medien statt Adenosin-5'-monophosphat Adenosin-3'-monophosphat in gleicher Molarität zugesetzt.
2. Zugabe von 10 mM Natriumfluorid zum Medium.
3. Als Substrat wurde dem Medium statt Adenosin-5'-monophosphat Glycerin-2-phosphat, Dinatriumsalz in gleicher Molarität zugesetzt. Dies wurde bei einem End-pH von 7,2 und 9,0 durchgeführt.
4. Zugabe von 0,1 mM L-p-Bromtetramisol zum Medium und zu der unter 1. aufgeführten Spezifitätskontrolle.
5. Inkubation ohne Zugabe von Substrat.

2.7 Elektronenmikroskopische Darstellung der 5'-Nukleotidase-Aktivität

Die Materialgewinnung erfolgte wie schon für die elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung beschrieben. Die Fixierung wurde von dem elektronenmikroskopischen Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität übernommen. Zusätzlich wurde folgende Fixierung angewendet:

Formaldehyd, aus Paraformaldehyd frisch depolymerisiert, 4 %; Natriumcacodylat 0,1 M; Magnesiumchlorid 50 mM; Calciumchlorid 70 mM; End-pH 7.2; ca. 1700 m Osmol.

Auch diese Fixierung wurde nach Vorspülung mit 80-100 ml eisgekühltem Spülpuffer bei einer Temperatur von 0-4 °C in einer Menge von 80-100 ml zur Perfusion verwendet. Dann wurden streichholzstarke Streifen des gut perfundierten Gewebes in der gleichen Fixierung 24 Std. immersionsfixiert. Die Spülung in Spülpuffer erfolgte nach den Angaben für die elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung.

Die Herstellung der Tissue Sectioner-Schnitte entsprach den Angaben, die für den elektronenoptischen Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität gemacht wurden. Die auf dem Tissue Sectioner angefertigten Dickschnitte wurden in eiskaltem Spülpuffer aufgefangen und sofort zum Enzymnachweis verwendet.

Das Inkubationsmedium entsprach dem schon für die lichtmikroskopischen Untersuchungen verwendeten Ansatz nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1961). Die Schnitte wurden 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Spülung erfolgte 3 mal 5 min in eiskaltem Spülpuffer. Nach dieser Spülung war das Vorgehen zur elektronenmikroskopischen Einbettung entsprechend dem für die elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung, d.h. es schlossen sich die Osmierung, Blockkontrastierung und Entwässerung an.

Alternativ wurde eine Nachbehandlung mit 2 mal 5 min Spülpuffer und danach 2 mal 5 min s-Collidinpuffer nach BENNETT und LUFT (1959) vorgenommen. Dann erfolgte die Osmierung in s-Collidinpuffer, wie oben für den elektronenoptischen Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität beschrieben. Die so behandelten Schnitte wurden bei der elektronenmikroskopischen Einbettung nicht blockkontrastiert, sondern kamen nach der Osmierung und der anschließenden zweimaligen Spülung in s-Collidinpuffer direkt zur Entwässerung.

Von den in Kunststoff eingebetteten Blöckchen wurden zur Kontrolle Semidünnschnitte hergestellt, wie es für den elektronenmikroskopischen Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität angegeben ist.

2.8 Doppelinkubation

Um die alkalische Phosphatase- und die 5'-Nase-Aktivität am selben Schnitt darzustellen, wurde eine Doppelinkubation vorgenommen. Als Material dienten native Kryostat-schnitte, die für 10 min bei 0-4 °C in Formol-Calcium nachfixiert und anschließend 2 mal 2 min in 0,15 M NaCl bei Zimmertemperatur gespült wurden.

Zuerst erfolgte der Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität mit der Azofarbstoffmethode nach STUTTE (1967). Die Schnitte wurden 30 min bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte 3 mal 5 min in 0,15 M NaCl bei Zimmertemperatur gespült.

Für den Nachweis der 5'-Nase-Aktivität erfolgte nun die Inkubation in dem Medium nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1961) für 60 min bei 37 °C sowie die Nachbehandlung, wie für den Nachweis der alkalischen Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) angegeben:

2.9 Aufeinanderfolgende Darstellung IgM-tragender Lymphozyten mit der Immunfluoreszenzmethode nach GUTMAN und WEISSMAN und der 5'-Nukleotidase-Aktivität nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER an demselben Schnitt

Schweinemilzen wurden entsprechend der Technik der Per-fusionsfixierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen mit 150 ml eisgekühlter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) nach DULBECCO ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , pH 7,6, durch-spült und auf Eis gelagert. Spätestens eine halbe Stunde nach der Perfusion wurden von diesem Material Blöckchen von 3-4 mm Kantenlänge und 3 mm Dicke hergestellt, die mit flüssigem CO_2 auf Kryostatische montiert und in den Kryo-staten verbracht wurden.

Von diesen wurden 10 µm dicke Kryostatschnitte hergestellt und auf Chromalaungelatine-beschichtete Objektträger aufge-zogen. Nach Lufttrocknung für 20 min bei Zimmertemperatur wurden die Schnitte 10 min in Aceton, ebenfalls bei Zimmer-

temperatur, fixiert und für 2 min in PBS gespült.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit anti-Schwein IgM Antiserum aus dem Kaninchen (RaSw-IgM, Fc-Fragment, Fa. Nordic) in einer Verdünnung von 1:20 mit PBS für 20 min in der feuchten Kammer.

Es wurde 3 mal mit PBS für insgesamt 20 min gespült.

Die Inkubation mit dem zweiten, TRITC-konjugierten anti-Kaninchen Ig Antiserum aus der Ziege (GaRIg-TRITC, Fa. Nordic) in einer Verdünnung von 1:20 mit PBS fand unter denselben Bedingungen statt, wie die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Das verdünnte TRITC-konjugierte Antiserum wurde vor Gebrauch filtriert (Millipore Filter, Porengröße 0,22 μ m).

Die anschließende Spülung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Die feuchten Schnitte wurden mit gepuffertem Glycerin (9 Teile Glycerin, 1 Teil PBS, pH 7,6) eingedeckt und mit einem LEITZ-Fluoreszenzmikroskop über Auflichtanregung mit einem Ploemopak-Illuminator (Filterkombination N 2) untersucht.

Von den Follikeln, sowie von Ausschnitten aus der Randzone des fluoreszierenden follikulären Gebietes wurden Fotografien hergestellt (Film: Ilford HP 5).

Anschließend wurden die Schnitte zum Ablösen der Deckgläschen in PBS eingestellt und dann zunächst 15 min bei 4 °C in Formol-Calcium fixiert und, wie bereits beschrieben, in 0,15 M NaCl gespült.

Der Nachweis der 5'-Nukleotidase-Aktivität nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1961) erfolgte für 45 min bei 37 °C; Nachbehandlung wie für den Nachweis der alkalischen Phosphatase nach HUGON und BORGERS (1966) beschrieben.

Von den zuvor aufgenommenen Gebieten wurden erneut Fotografien hergestellt (Film: Kodak Panatomic X).

Zu Kontrollzwecken wurde der Nachweis nach GUTMAN und WEISSMAN unter Verzicht auf das erste Antiserum durchgeführt.

3. Befunde:

Die Struktur der weißen Pulpa der Schweinemilz soll zunächst anhand der an Paraffin- und Semidünnschnitten erhobenen Befunde beschrieben werden, um für die dann folgenden lichtmikroskopischen Untersuchungen sowie für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der B-zellabhängigen Gebiete topographisch eine Orientierung zu geben. Anschließend erfolgt die Auswertung der ultrahistochemischen Enzymnachweise. Wegen des schlechten Strukturerhalts dieser Präparate muß die ultrastrukturelle Beschreibung der Zytologie an speziell für diesen Zweck fixiertem Material gesondert durchgeführt werden.

Da sich herausgestellt hat, daß die untersuchten Enzymaktivitäten überwiegend an nichtlymphatischen Zellen der weißen Pulpa lokalisiert sind, ist es erforderlich, sich zunächst auf eine eindeutige Benennung dieser Zellen festzulegen. Hierzu wurde auf die bereits in der Einleitung zitierte Nomenklatur von MÜLLER-HERMELINK und LENNERT (1978) zurückgegriffen.

3.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen an Paraffin- und Semidünnschnitten

3.1.1 Hämalalaun-Erythrosin-Färbung

Mit dieser Kern-Plasma-Färbung läßt sich die weiße Pulpa auf Grund ihrer besonders hohen Zelldichte leicht identifizieren. Die durch einen netzartigen Verband glatter Muskelzellen charakterisierte rote Pulpa ist weniger zell-dicht, während die Marginalzone in dieser Hinsicht eine Mittelstellung einnimmt.

Um einen Überblick über den Bau der weißen Milzpulpa zu gewinnen, empfiehlt es sich, dem Verlauf der arteriellen Gefäße zu folgen.

Nach Übertritt der Trabekelarterien in die Milzpulpa erhalten diese eine Umhüllung aus lymphatischem Gewebe;

die PALS. Diese ist überwiegend von kleinen Lymphozyten besiedelt, die sich mit Hilfe der HE-Färbung durch ihre runden, kräftig blau gefärbten Kerne darstellen lassen. Daneben kommen als weitere freie Zellen Granulozyten vor, die sich durch ihre charakteristisch segmentierten Kerne auszeichnen. Erythrozyten werden in der gesamten PALS gefunden. Neben diesen lymphatischen und sonstigen hämatogenen Zellen findet sich in der PALS ein Zelltyp, der dreieckige oder spindelige Kerne aufweist und feine Fortsätze zwischen die umgebenden Zellen schickt.

In der inneren PALS ist schließlich ein Zelltyp angesiedelt, dessen hellen unregelmäßig geformten Kernen am Paraffinschnitt kein Zytoplasma zugeordnet werden kann.

Die Zentralarterie gibt weitlumige Gefäßäste ab, die die Follikel versorgen. Diese sitzen der PALS exzentrisch auf, wobei kleinere Follikel auch in die PALS eingelagert sein können, ohne diese besonders hervorzuwölben.

Bei den untersuchten Tieren wurden ausschließlich Sekundärfollikel gefunden, deren Kennzeichen es ist, daß sie ein helleres Keimzentrum besitzen, welches vom Lymphozytenmantel, einer dichten Zone kleiner basophiler Lymphozyten, wie sie mit entsprechender Morphologie bereits in der PALS vorgefunden wurden, umgeben wird. Der Lymphozytenmantel enthält in geringerer Anzahl auch Zellen, die große, helle, vorwiegend oval geformte Kerne besitzen, denen am Paraffinschnitt ebenfalls kein Zytoplasma zugeordnet werden kann.

Im helleren Keimzentrum liegen die Zellen lockerer als im Lymphozytenmantel. Hier befinden sich lymphatische Zellen unterschiedlicher Größe, deren Kerne heller erscheinen als die der kleinen Mantellymphozyten. Die helle und die dunkle Zone des Keimzentrums sind an Paraffinschnitten nicht eindeutig differenzierbar.

Gegen die Marginalzone ist der Follikel deutlich abgesetzt. Im Grenzgebiet liegen langgestreckte Zellen mit spindeligen Kernen, die den Follikel in mehreren Schichten konzentrisch umschließen. Zwischen diese Zellen sind wiederum

kleine Lymphozyten eingelagert. Freie Blutzellen, wie Erythrozyten, werden erst im Bereich der peripheren Zelllagen gefunden.

Die Marginalzone enthält die großen SCHWEIGGER-SEIDEL'schen Hülsen, deren Kapillaren aus den Pinselarteriolen hervorgehen. Während die locker strukturierte Marginalzone, die neben lymphatischen Zellen viele freie Blutzellen und Kapillaren enthält, gegen die Follikel und die PALS deutlich abgesetzt ist, ist ihr Übergang zur roten Pulpa fließend.

Während bei den meisten Spezies eine Unterscheidung zwischen Follikeln und PALS aufgrund der Tatsache vorgenommen werden kann, daß die PALS die großkalibrige Zentralarterie enthält, die Follikel jedoch nur durch kleinlumige Gefäßäste versorgt werden, ist dies beim Schwein nicht möglich. Zur Unterscheidung dient hier für die Follikel das Vorhandensein von Keimzentren, das Fehlen freier Blutzellen sowie das durch langgestreckte, spindelige Zellen gekennzeichnete Grenzgebiet zwischen Follikeln und Marginalzone. Eine definitive Bestimmung ist über einen Nachweis von Membranrezeptoren der B-Lymphozyten möglich, über den weiter unten berichtet wird.

3.1.2 Färbung von Kunststoffsemidünnschnitten mit LÖFFLER's Methyleneblau und STEVENEL's Blau

Im Vergleich zu Paraffinschnitten ermöglichen die Kunststoffsemidünnschnitte aufgrund ihres besseren Gewebeerhalts und der geringeren Schnittdicke eine bessere zytologische Differenzierung im Bereich der weißen Pulpa. Während die Färbung mit LÖFFLER's Methyleneblau routinemäßig zu Übersichtszwecken vor dem Ultradünnschneiden verwendet wurde, sind mit STEVENEL's Blau gesondert Semidünnschnitte angefärbt worden, da diese Färbung neben Blau auch Rottöne erzeugt und damit eine besonders gute Zuordnung der einzelnen Zelltypen der weißen Pulpa erlaubt.

In der PALS werden als freie Zellen hauptsächlich Lymphozyten gefunden. Ihre runden heterochromatinreichen Kerne sind von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben. Daneben sind auch Plasmazellen nachweisbar, deren exzentrisch gelegener Zellkern eine radspeichenartige Chromatinstruktur besitzt. Ihr Zytoplasma ist ebenfalls stark basophil. Hinsichtlich nichtlymphatischer hämatogener Zellen treten außer segmentkernigen Granulozyten auch Erythrozyten auf, die sich häufig in den Randbereichen der PALS konzentrieren.

In den inneren Bezirken der PALS liegen Zellen mit heterochromatinarmen, unregelmäßig geformten Kernen, deren nur schwach anfärbbares Zytoplasma sich zwischen die umgebenden Lymphozyten schiebt. Struktur und Topographie dieser Zellen entsprechen den von IDZ bekannten Verhältnissen.

In der gesamten PALS werden Zellen gefunden, die spindelige oder dreieckige Kerne besitzen, deren Heterochromatin vorwiegend marginal kondensiert ist. Ein Nukleolus ist nur selten sichtbar. Diesen Zellen läßt sich nur wenig Zytoplasma zuordnen, welches sich kräftig anfärbt und feine Fortsätze zwischen die umgebenden Lymphozyten entläßt. Diese Fortsätze zeigen häufig eine Dreischichtung, wobei zwei zarte, mit Methylenblau gut anfärbbare Strukturen eine mittlere helle Struktur einschließen.

Die Verteilung dieses Zelltyps und seiner Fortsätze ist jedoch nicht gleichmäßig. Während er in der inneren PALS weniger häufig vertreten ist und eher Sternformen ausbildet, liegen die Zellen an der äußeren Oberfläche der PALS dichter und besitzen häufig spindelige Form.

Der PALS sitzen die Sekundärfollikel auf, deren Keimzentren nicht selten in eine helle und eine dunkle Zone unterteilbar sind. Die sichelförmige dunkle Zone, welche der PALS zugekehrt ist, enthält stark basophile Lymphoblasten.

Den größeren Teil des Keimzentrums nimmt die helle Zone ein. Sie enthält neben lymphatischen Zellen, welche sich durch runde Kerne und starke Basophilie auszeichnen, auch

die für das Keimzentrum charakteristischen DRZ. Ihnen sind sehr große heterochromatinarme Kerne eigen; neben ovalen Kernformen treten auch unregelmäßig gebuchtete Kerne auf. In beiden Kerntypen sind meist ein bis zwei deutliche Nukleolen nachweisbar. Ihnen kann nur sehr wenig helles Zytoplasma zugeordnet werden.

Mit der STEVENEL's Blau-Färbung sind im Keimzentrum besonders deutlich die hier lokalisierten Makrophagen auf Grund ihrer Einschlüsse phagozytierten Materials zu erkennen.

Der sich an das Keimzentrum peripher anschließende Lymphozytenmantel ist vorwiegend von kleinen Lymphozyten besiedelt. Zwischen ihnen liegen vereinzelt große, helle, meist oval geformte Kerne, in denen ein bis zwei Nukleolen vorhanden sind. Diesen Kernen kann ein schmaler, nur schwach basophiler Zytoplasmasaum zugeordnet werden.

Die Grenzzone zwischen Lymphozytenmantel und Marginalzone weist langgestreckte, spindelige Zellen auf, die tangential zur Follikeloberfläche orientiert sind. Diese Zellen färben sich mit Methylenblau gut an und senden feine Fortsätze aus, die gelegentlich eine Dreischichtung erkennen lassen. Während der zentrale Bereich aufgehell ist, liegen außen zwei schmale, gut färbbare, lineare Strukturen. Diese Zellen bilden mit ihren Fortsätzen ein Netzwerk, in welches freie Zellen eingeschlossen werden. Dabei handelt es sich zentral nur um Lymphozyten und Plasmazellen; Erythrozyten und Granulozyten finden sich in geringen Mengen erst in den peripheren Bereichen dieser Grenzzone. Oberflächlich liegen in dieser Zone zwischen langgestreckten Zellen auch einzelne glatte Muskelzellen, die deutlich dunkler gefärbt sind und ebenfalls spindelige Form besitzen. Glatte Muskelzellen liegen ferner an der Grenze zwischen PALS und Marginalzone. Bis an diese Schicht lassen sich am Semidünnschnitt die verlängerten Hülsenkapillaren der Marginalzone verfolgen, zentral davon in der weißen Pulpa werden nur sehr selten Kapillaren gesehen.

3.1.3 Färbung nach PASINI

Um die Verteilung des extrazellulären Materials, insbesondere der Bindegewebsfasern, zu studieren, wurden einerseits vorhandene Bindegewebsimprägnierungen (Technik nach NOVOTNY-GOMMERT 1977) untersucht, andererseits Paraffinschnitte mit der Technik nach PASINI gefärbt. Diese stellt die Zellkerne rot dar, das Zytoplasma hellblau sowie extrazelluläres Material leuchtend dunkelblau.

Es soll im folgenden nicht noch einmal auf die dargestellten Zellen eingegangen, sondern nur das extrazelluläre Grundgerüst der weißen Pulpa beschrieben werden.

In der PALS ist das extrazelluläre Material häufig parallel zur Zentralarterie angeordnet, was auf Längsschnitten besonders gut zu erkennen ist. In Querschnitten sieht man um die Zentralarterie meist ein bis zwei Zirkulärschichten, die an ein lockeres Maschenwerk Anschluß finden, welches die gesamte PALS durchzieht. Zur Oberfläche hin werden die Maschen dichter, und auch die Dicke der Faserstränge nimmt in diesem Bereich zu.

Das extrazelluläre Gerüst der PALS setzt sich, wie bei günstiger Schnittführung ersichtlich ist, auf die Oberfläche der Follikel fort. Es umgibt sie in mehreren oberflächenparallelen Lagen, die untereinander spitzwinklig verbunden sind, sodaß ein längliches Maschenwerk entsteht. Die Dicke der dargestellten Faserstränge entspricht denen an der Oberfläche der PALS.

In der Marginalzone ergeben feine Fasern ein lockeres dreidimensionales Grundgerüst.

In den Follikeln ist meist kein extrazelluläres Material nachweisbar; gelegentlich finden sich jedoch breite Faserzüge, die von der Peripherie her zum Keimzentrum hinziehen, also radiären Verlauf nehmen. Im Keimzentrum selbst lassen sich nur sehr geringe Mengen extrazellulären Materials mit diesen Techniken darstellen.

Die Frage, mit welchen Zellen das extrazelluläre Material

assoziiert ist, läßt sich an Hand von lichtmikroskopischen Untersuchungen nicht mit Sicherheit beantworten. Im Bereich der PALS und im Grenzgebiet zwischen Marginalzone und Follikel kann jedoch vermutet werden, daß eine Beziehung zwischen dem extrazellulären Material und den hier lokalisierten stern- bzw. spindelförmigen Zellen besteht. Im Bereich des Lymphozytenmantels der Sekundärfollikel ist es nicht möglich, das extrazelluläre Material mit einem bestimmten Zelltyp in Verbindung zu bringen.

3.1.4 PAS-Reaktion

Mit dieser Technik lassen sich zunächst innerhalb der Trabekel netzartige, im Längsschnitt wellige Strukturen darstellen. Das gleiche Bild zeigt die Tunica media größerer Gefäße, deren Lamina elastica interna ebenfalls positiv reagiert.

In der weißen Pulpa decken sich die PAS-positiven Strukturen mit dem Bild, welches die Technik nach PASINI und die Bindegewebsimprägnierung ergibt:

Innerhalb der PALS wird eine feine rote Netzstruktur nachgewiesen, die in Verbindung mit PAS-positiven Strukturen steht, welche an der Grenze zwischen Follikel und Marginalzone tangential zur Oberfläche des Follikels verlaufen. Während der Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel negativ reagiert, sind in den Keimzentren blaßrote Netze mit runden Maschen vorhanden.

3.1.5 Färbung nach PUCHTLER et al.

Diese Färbung, die von PUCHTLER et al. (1974) entwickelt wurde, um Myosin und verwandte Proteine in den Zellen darzustellen, benutzt den Farbstoff Levanol-Echt-Cyanin 5 RN, um die Myosinfilamente blau anzufärben. Als Kernfarbstoff wird Kernechtrot verwendet.

In den Paraffinschnitten stellen sich die Muskulatur der Trabekel und die Muskulatur der roten Pulpa kräftig blau dar. Die Tunica media der Blutgefäße weist zartblaue Färbung in den Muskelzellen auf.

Im Bereich des äußeren Grenzgebietes zwischen Follikel und Marginalzone sowie an der Grenze zwischen PALS und Marginalzone zeigen sich ebenfalls einzelne glatte Muskelzellen. Zentral von dieser Zone sind in der weißen Pulpa keine mit Levanol-Echt-Cyanin 5 RN darstellbaren Zellen vorhanden.

3.2 Lichtmikroskopische enzymhistochemische Untersuchungen

Die Nachweise wurden zum Teil direkt an nativen Kryostat-schnitten durchgeführt, zum Teil wurden native Schnitte vor der Inkubation in 4 %igem säurefreiem Formol unter Zusatz von 1 % CaCl_2 für 10 min fixiert. Da die Lokalisationsschärfe der Präzipitate an nachfixierten Schnitten der der nativ inkubierten Schnitte überlegen war, wurden vor allem diese zur Auswertung herangezogen. Die von diesem Material hergestellten Schnittserien erlauben eine Rekonstruktion der räumlichen Verteilung der Enzymaktivitäten. Jedoch ist an Kryostatschnitten, im Gegensatz zu Semidünnschnitten, aufgrund der schlechteren Strukturerhaltung und der höheren Schnittdicke auch unter Zuhilfenahme einer Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach MAYER keine eindeutige Zuordnung der Präzipitate zu bestimmten Zellen und Strukturen möglich.

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung kamen auch Kryostat-schnitte des für die ultrahistochemische Untersuchung perfusionsfixierten Materials. Diese wurden zu Kontrollzwecken hergestellt, um zu testen, ob die nach der Fixierung verbliebenen Aktivitäten noch ausreichen, um bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung nachweisbare Mengen von Reaktionsprodukt zu liefern. Daneben wurde an diesem Material die Empfindlichkeit der Nachweise und damit ihre Eignung für die ultrahistochemische Untersuchung verglichen.

Da das fixierte Material in Spülpuffer haltbar ist, kann hieran auch der Einfluß der Lagerung auf die Enzymaktivitäten untersucht werden.

Die Verwendung von Semidünnschnitten des für die Elektronenmikroskopie in Kunststoff eingebetteten Materials hat gegenüber Kryostatschnitten den Nachteil, daß die Anfertigung größerer Schnittserien schwierig ist und auch nur Blöcke mit kleinen Flächen geschnitten werden können. Aufgrund der geringen Schnittdicke und der guten Gewebeerhaltung ist jedoch eine bessere Zuordnung der Präzipitate zu bestimmten Gewebestrukturen möglich. Aufschlußreiche Präparate erhält man besonders bei gleichzeitiger oder alternierender Behandlung der Semidünnschnitte mit Ammoniumsulfid und LÖFFLER's Methylenblau.

3.2.1 Lichtmikroskopische Untersuchung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

3.2.1.1 Azofarbstoffnachweis nach STUTTE

Die Untersuchung nachfixierter Kryostatschnitte ergibt am arteriellen Gefäßbaum der Milz ein interessantes Bild, das hier etwas ausführlicher beschrieben werden soll.

Die großen Trabekelarterien, die noch durch eine selbständige Adventitia innerhalb der Trabekel gekennzeichnet sind, zeigen keine alkalische Phosphatase-Aktivität. Kleinere Trabekelarterien besitzen dagegen Aktivität am Endothel, die übrigen Strukturen der Wand bleiben jedoch negativ. Dieses Verteilungsmuster bleibt generell auch im Bereich der Zentral- und Follikelarterien erhalten, wobei die Intensität der Reaktion von Tier zu Tier etwas schwanken kann.

Eigentümlicherweise wechseln aber bei einzelnen Tieren positiv reagierende Abschnitte der Zentral- und Follikelarterien mit solchen ohne nachweisbare Aktivität ab, ohne daß sich hierfür technische Ursachen erkennen ließen. Ebenso besteht auch keine offenkundige topographische Abhängigkeit für

dieses unterschiedliche Verhalten des Endothels.

Der distale Bereich des arteriellen Gefäßschenkels, das heißt also das Kapillarendothel der SCHWEIGGER-SEIDELschen Hülssen, ist ebenfalls positiv, auch hier treten individuelle Intensitätsunterschiede auf. Nie lassen sich dagegen alkalische Phosphatase-positive Follikelkapillaren beobachten.

In der weißen Pulpa finden sich folgende Verhältnisse:

Die funktionellen und gerüstbildenden Zellen der PALS bleiben frei von Reaktionsprodukt. Nur einige neutrophile Granulozyten markieren sich kräftig rot.

Die MALPIGHIschen Körperchen liegen in dem untersuchten Material überwiegend als Sekundärfollikel vor, deren Keimzentrum in Abhängigkeit von der Schnittrichtung eine enzymaktive und eine inaktive Zone erkennen läßt. Die negative Zone des Keimzentrums liegt zentral, d.h. näher zur PALS als die mehr peripher gelegene positive Zone. Diese zonale Gliederung der alkalischen Phosphatase-Aktivität stimmt mit der zentralen dunklen und der peripheren hellen Zone des Keimzentrums überein. In der aktiven Zone des Keimzentrums zeigt sich meist blaßrotes Reaktionsprodukt, welches ein engmaschiges Netz bildet. Zellkerne bleiben eindeutig ohne Reaktion. Bei einigen Tieren fehlt die Keimzentrumsreaktion, wobei aber offenbleiben muß, ob die Empfindlichkeit der Azofarbstoffmethode ausreicht, sehr schwache Aktivitäten darzustellen.

Im Bereich der Mantellymphozyten findet sich ein kräftig rotes Reaktionsprodukt. Es bildet ein feines Netzwerk linearer Strukturen, die rundlich-ovale Maschen einschließen. Wiederum in Abhängigkeit von der Schnittrichtung bleibt bei vielen Follikeln im Grenzgebiet zur PALS ein Segment frei von Aktivität. Diese Follikel markieren sich bereits bei Übersichtsvergrößerungen als zur PALS geöffnete rote Spangen.

Die Marginalzone, die sowohl die PALS als auch die Follikel umschließt, wird von stark positiven neutrophilen Granulo-

zyten besiedelt und bleibt ansonsten ohne nachweisbare alkalische Phosphatase-Aktivität. Die in der Marginalzone liegenden SCHWEIGGER-SEIDELschen Kapillarröhren weisen mit Ausnahme des bereits oben erwähnten Endothels der Kapillaren keine Enzymaktivität auf.

Auch für den ultrahistochemischen Nachweis perfusionsfixiertes Gewebe wurde mit diesem Medium inkubiert. Hier konnte im Zentrum der Sekundärfollikel meist keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Ansonsten stimmte der Befund mit dem an nativen, nachfixierten Kryostatschnitten erhobenen gut überein, wobei der rote Azofarbstoff im Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel noch präziser ein engmaschiges Netz darstellt.

Nach einwöchiger Lagerung in Spülpuffer bei Kühlschranktemperatur ist die Aktivität am Endothel der Follikel- und Zentralarterien reduziert. Die netzförmige Zeichnung im Lymphozytenmantel ist zwar verschwommen, jedoch noch deutlich erkennbar. Granulozyten sowie Endothelien der Hülsekapillaren zeigen ebenfalls noch nachweisbare Aktivität.

Zugabe von L-p-Bromtetramisol führt zu vollständiger Hemmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität in allen Strukturen.

Ebenso führt Inkubation unter Zusatz von L-Cystein zu einem vollständig negativen Ergebnis.

3.2.1.2 Nachweis nach HUGON und BORGERS

Nachweisbare alkalische Phosphatase-Aktivität wird bei dieser Technik durch einen feinkörnigen braunen Niederschlag angezeigt. Da im Inkubationsmedium kein zusätzlicher Komplexbildner enthalten ist, bleibt es meist nur für kurze Zeit stabil.

Mit der Originalmethode werden an nachfixierten Kryostatschnitten auch bei leichter Trübung des Mediums technisch zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. Die Lokalisation

des Präzipitats stimmt mit der für den Nachweis nach STUTTE beschriebenen überein.

Perfusionsfixiertes Gewebe zeigt bereits nach zweitägiger Lagerung in Spülpuffer bei Kühlschranktemperatur Aktivitätsverluste im Bereich des Lymphozytenmantels. Nach noch längerer Lagerung nimmt die Aktivität in dieser Lokalisation stark ab. Aktivität im Bereich des Keimzentrums der Sekundärfollikel wird an perfusionsfixiertem Material nicht gefunden.

Semidünnschnitte des nach Inkubation mit diesem Medium für ultrahistochemische Zwecke eingebetteten Materials zeigen nicht selten Verschmutzungen mit grobkörnigem Präzipitat sowie Niederschläge innerhalb der Zellkerne. Dagegen erbringt die Inkubation mit dem modifizierten Medium reproduzierbare, technisch gute Präparate (Abb. 1 und 2). Die hiervon hergestellten Semidünnschnitte wurden alternierend mit Ammoniumsulfid und Methylenblau behandelt.

Im Lymphozytenmantel zeigt sich Reaktionsprodukt an länglichen netzbildenden Strukturen, die zwischen den Lymphozyten entlangziehen (Abb. 2). Sie sind jedoch auch mit Hilfe der Methylenblau gefärbten Schnitte nicht eindeutig einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen. Innerhalb der Zellen wird keine Aktivität gefunden.

Das Zentrum der Follikel enthält im Semidünnschnitt kein Präzipitat. An Granulozyten und Endothelien der Hülsenkapillaren wird regelmäßig Aktivität nachgewiesen, dagegen verhalten sich die Zentral- und Follikelarterien unterschiedlich. Sie können deutliche Niederschläge aufweisen oder auch ganz frei von ihnen sein. Das Präzipitat in den mit Glyceringelatine eingedeckten Schnitten verblaßt innerhalb weniger Tage.

Die Zugabe von L-p-Bromtetramisol zum Medium führt zu vollständiger Inaktivierung. Zugabe einer gleichen Menge D-p-Bromtetramisol zieht dagegen keine Aktivitätsminderung nach sich.

3.2.1.3 Nachweis nach MAYAHARA et al.

Dieser Nachweis wurde nur an nachfixierten Kryostatschnitten durchgeführt. Das Ergebnis der Inkubation entspricht dem mit dem Nachweis nach HUGON und BORGERS erzielten. Der Nachweis erbringt technisch gute Präparate.

Die Inkubation mit L-p-Bromtetramisol im Medium ergibt eine vollständige Hemmung der Enzymaktivität. Zugabe einer gleichen Menge D-p-Bromtetramisol führt nicht zu Aktivitätseinbußen.

Präinkubation für eine Stunde in 6,25 %igem Glutaraldehyd bei 60 °C inaktiviert das Enzym ebenfalls vollständig. Auch bei Inkubationen in substratfreiem Medium werden keine Niederschläge angetroffen.

3.2.1.4 Nachweis nach TRANZER

Dieser Nachweis erbrachte sowohl bei Inkubation von nativen Kryostatschnitten als auch an perfusionsfixiertem Material keine spezifische Reaktion der weißen Pulpa.

3.2.1.5 Nachweis nach MIZUTANI

Die Inkubation der nachfixierten Kryostatschnitte erbringt ein technisch unbefriedigendes Ergebnis.

Die Granulozyten der Marginalzone werden zwar mit diesem Nachweis deutlich enzymaktiv dargestellt, im Bereich des Lymphozytenmantels der Sekundärfollikel findet sich jedoch nur unscharf lokalisiertes Reaktionsprodukt. Gleichzeitig liegen hier häufig grobkörnige Verschmutzungen vor. An den Endothelien der Zentral- und Follikelarterien zeigen sich nur geringe Mengen Reaktionsproduktes; die Endothelien der Hülsenkapillaren reagieren individuell unterschiedlich, weisen meist jedoch nur geringe Mengen Präzipitats auf.

Für ultrahistochemische Zwecke perfusionsfixiertes Material

verhält sich grundsätzlich, wie für die nachfixierten Kryostatschnitte beschrieben. Dieses Material zeigte nach dreitägiger Aufbewahrung in Spülpuffer keine Aktivität im Bereich des Lymphozytenmantels mehr.

Zugabe von L-p-Bromtetramisol führt zu vollständiger Inhibition des Enzyms.

3.2.1.6 Nachweis nach GOMORI

Diese Technik wurde sowohl an nachfixierten Kryostatschnitten als auch an solchen von perfusionsfixiertem Material angewendet.

Kryostatschnitte von perfusionsfixiertem Material zeigen eine graubraune Hintergrundfärbung, von der sich die dargestellten Strukturen jedoch deutlich abheben. Das dargestellte Verteilungsmuster der alkalischen Phosphatase-Aktivität entspricht dem für den Azofarbstoffnachweis nach STUTTE beschriebenen.

Die GOMORI-Technik hat sich als besonders empfindlich erwiesen, sodaß die Reaktion in der hellen Zone der Keimzentren an nachfixierten Kryostatschnitten meist deutlich nachweisbar ist.

Auch nach fünftägiger Lagerung des perfusionsfixierten Materials in Spülpuffer weist die Lymphozytenmantelzone der Sekundärfollikel noch Aktivität auf. Das Reaktionsprodukt ist dann allerdings diffus verteilt, ohne eine Netzstruktur zu zeigen. Eine Parallelinkubation von Schnitten des gleichen Materials mit dem Nachweis nach STUTTE erbringt in der Zone der Mantellymphozyten noch undeutlich netzförmig verteilte Aktivitätsmuster. Aktivität in den Keimzentren ist an diesem Material auch mit der Methode nach GOMORI nicht darstellbar.

3.2.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der 5'-Nukleotidase-Aktivität

3.2.2.1 Nachweis nach WACHSTEIN und MEISEL

Die Untersuchung der nativen, mit Formol-Calcium nachfixierten Kryostatschnitte ergibt folgendes Bild:

Das Reaktionsprodukt des Nachweises ist ein kräftig brauner Niederschlag. Dieser besetzt zunächst in großen Mengen die Endothelien der Trabekelarterien und -venen, sowie auch die der Zentral- und Follikelarterien, ohne weitere Strukturen der Wand dieser Gefäße zu markieren.

Die PALS wird von einem Netz enzymaktiver Maschen durchzogen, deren Form von den lokal unterschiedlichen Verhältnissen in der PALS abhängt. In Abschnitten der PALS, die über weite Strecken ungestört durch Follikel verlaufen, treten die 5'-Nase-positiven Strukturen vorwiegend in paralleler Anordnung und längs zum Verlauf der PALS gerichtet auf. Die längsverlaufenden enzymaktiven Strukturen werden durch etwas dünnere querverlaufende Abschnitte verbunden, woraus auf Querschnitten eine näherungsweise hexagonale Form der Maschen resultiert. Häufig liegen in der PALS jedoch kleinere Follikel. In der Nachbarschaft dieser Abschnitte ist auch an Längsschnitten keine deutlich parallele Ausrichtung der enzymaktiven Netzmaschen zu erkennen.

An der äußeren Oberfläche der PALS verdichtet sich das Netzwerk, sodaß die Maschenweite geringer wird. Gleichzeitig sind die markierten Strukturen hier etwas dicker als im Innern der PALS.

Bei günstiger Schnittführung kann festgestellt werden, daß das enzymaktive Netz der PALS in ein den Follikel umziehendes Netz übergeht. Es besteht hier aus groben, länglichen Maschen, die dadurch entstehen, daß tangential zur Follikeloberfläche verlaufende Strukturen untereinander spitzwinklige Verbindungen ausbilden. Die Dicke dieser Zone ist unterschiedlich. Es können zwei bei fünf Schichten vorhanden

sein. Aus dieser kräftig 5'-Nase-positiven Zone treten dünnere und weniger stark reagierende Strukturen zentralwärts in den Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel und verlieren sich dort.

An der Grenze zwischen Follikel und PALS tritt das die PALS durchziehende Netz direkt an den Follikel heran, ohne zu diesem deutlich oberflächenparallele Ausrichtung anzunehmen.

Im Zentrum der Follikel kann diffuse Aktivität vorhanden sein, die sich keinen definierten Strukturen zuordnen läßt.

Die außerhalb des 5'-Nase-positiven Bereichs liegende Marginalzone bleibt frei von Aktivität. Die in ihr enthaltenen SCHWEIGGER-SEIDELschen Hülsen sind in der Regel negativ, nur bei einzelnen Tieren weisen die Hülsenzellen sehr schwache, diffuse Färbung auf. Das Endothel der Hülsenkapillaren reagiert individuell unterschiedlich; im allgemeinen findet sich hier nur eine schwache Reaktion.

Die rote Pulpa zeigt diffuse, mittelstarke Aktivität. Mit diesem Nachweis hebt sich die Marginalzone wegen ihrer negativen Reaktion deutlich gegen die rote Pulpa ab.

Nach Zugabe von NaF zum Medium bleibt nur äußerst schwache Restaktivität zurück.

Die Inkubation mit 3'-AMP als Substrat ergibt kein für die Spaltung von 5'-Nukleotiden spezifisches Aktivitätsmuster, sondern es reagieren nur einzelne Granulozyten. Die Inkubation mit 3'-AMP als Substrat unter gleichzeitiger Zugabe von L-p-Bromtetramisol führt zu einer Hemmung der Aktivität in mitreagierenden Granulozyten.

3.2.2.2 Nachweis nach YAMASHINA und KAWAI

Als Material diente für diesen Nachweis perfusionsfixiertes Gewebe. Die Kryostatschnitte wurden flottierend inkubiert. Das Medium ist häufig instabil und trübt sich innerhalb kurzer Zeit flockig. Nach Formol-Calcium-Fixierung entspricht die Lokalisation der 5'-Nase-Aktivität im Prinzip

dem Ergebnis der WACHSTEIN und MEISEL-Technik, ist aber deutlich unschärfer. Nach Glutaraldehydfixierung ist die Darstellung der netzförmig lokalisierten Enzymaktivität etwas deutlicher.

3.2.2.3 Nachweis nach UUSITALO und KARNOVSKY

Als Material wurden für diesen Nachweis native, nachfixierte Kryostatschnitte verwendet. Das Verteilungsmuster der Enzymaktivität ist mit dem Ergebnis der Technik nach WACHSTEIN und MEISEL identisch. Der braune Niederschlag markiert sehr scharf die enzymaktiven Gebiete der weißen Pulpa.

Zugabe von NaF bewirkt hier nur eine partielle Hemmung. Restaktivität wird an der Peripherie der weißen Pulpa wie auch an den Endothelien und in der roten Pulpa angetroffen.

3.2.2.4 Nachweis nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER

Native, mit Formol-Calcium nachfixierte Kryostatschnitte sowie für die Elektronenmikroskopie perfusionsfixiertes Material kamen für diese Technik zur Anwendung. Zusätzlich wurden von dem für elektronenoptische Zwecke in Kunststoff eingebetteten Gewebe mit Ammoniumsulfid behandelte Semidünnschnitte zur lichtmikroskopischen Untersuchung herangezogen.

Die Befunde waren mit denen der vorigen Nachweismethoden identisch. Kryostatschnitte des perfusionsfixierten Gewebes zeigen kein Reaktionsprodukt im Follikelzentrum. Insgesamt erscheinen die Präparate technisch besser, als die mit der Methode nach WACHSTEIN und MEISEL hergestellten, da die Lokalisation des Präzipitats schärfer ist. Gegenfärbung der Kryostatschnitte mit saurem Hämalan nach MAYER erlaubt auch hier keine eindeutige Zuordnung der Niederschläge zu bestimmten Strukturen. Untersuchungen von ammoniumsulfid-behandelten und mit LÖFFLER's Methylenblau gegengefärbten

Semidünnschnitten gestattet jedoch eine genauere Aussage. In der PALS scheint das Reaktionsprodukt mit den nicht-lymphatischen Zellen assoziiert, die die PALS mit einem Netz von Fortsätzen durchziehen (Abb. 3). An der Follikelperipherie gewinnt man den Eindruck, daß ebenfalls nicht-lymphatische Zellen, deren lange Fortsätze parallel zur Follikeloberfläche ausgerichtet sind, in Beziehung zu den Niederschlägen stehen (Abb. 3).

In den mit Glyceringelatine nach KAISER eingedeckten Semidünnschnitten ist das Präzipitat mehrere Wochen lang haltbar.

Bei Inkubation mit 3'-AMP können vereinzelte neutrophile Granulozyten Aktivität aufweisen, die durch Zugabe von L-p-Bromtetramisol gehemmt werden kann. Andere Strukturen lassen bei Inkubation mit 3'-AMP keine Aktivität erkennen. Wird dem Nachweismedium Glycerin-2-phosphat zugesetzt, so erscheint die Aktivität in den neutrophilen Granulozyten deutlicher. Erhöht man den pH des Mediums von 7,2 auf 8,9, so ist eine mäßige Reaktion im Bereich des Lymphozytenmantels sowie an den Endothelien der Hülsenkapillaren zu beobachten. Dagegen ist das für die Spaltung von 5'-Nukleotiden charakteristische Aktivitätsmuster nicht nachweisbar. Gleichzeitiger Zusatz von L-p-Bromtetramisol zu einem Medium mit dem Substrat 5'-AMP führt nicht zu einer Minderung der Menge an Reaktionsprodukt.

3.2.2.5 Nachweis nach BARRON und BOSCHES

Als Material wurden native, mit Formol-Calcium nachfixierte Kryostatschnitte verwendet.

Mit diesem Nachweis lassen sich hinsichtlich der Lokalisationsschärfe technisch gute Präparate erzielen. Das Reaktionsprodukt entspricht in Menge und Verteilung dem Nachweis nach WACHSTEIN und MEISEL.

Eine Kontrolle mit 3'-AMP als Substrat führt nicht zu nachweisbarem Reaktionsprodukt an 5'-Nase-positiven Strukturen.

3.2.3 Doppelinkubation mit dem Nachweis nach STUTTE für die alkalische Phosphatase-Aktivität und mit dem Nachweis nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER für die 5'-Nukleotidase-Aktivität

Die Doppelinkubation mit gleichzeitigem Nachweis der alkalischen Phosphatase- und 5'-Nase-Aktivität wurde durchgeführt, um die Beziehung der beiden enzymaktiven Zonen zueinander an der Follikelperipherie abzuklären (Abb. 4).

Die Zone der alkalischen Phosphatase-Aktivität im Bereich des Lymphozytenmantels der Sekundärfollikel schließt sich zentral nahtlos an die peripher gelegene Zone der 5'-Nase-Aktivität an, ohne daß eine Überlappung beider Gebiete nachweisbar wäre. An der Grenze des Follikels zur PALS befindet sich ein Segment, welches frei von Aktivität der alkalischen Phosphatase bleibt. Hier grenzt das 5'-Nase-positive Netz der PALS direkt an den Follikel; dabei läßt der Bereich, der sich alkalische Phosphatase-negativ verhält, auch keine 5'-Nase-positiven Strukturen erkennen (Abb. 4). Im Keimzentrum der Sekundärfollikel findet sich meist nur rötliche Färbung als Zeichen einer schwachen alkalischen Phosphatase-Aktivität. Schwache 5'-Nase-Aktivität, die durch ein bräunliches Präzipitat markiert ist, wird gelegentlich ebenfalls im Keimzentrum vorgefunden. Wegen der schwachen und diffusen Reaktion ließ sich die 5'-Nase-Aktivität nicht eindeutig einem definierten Bereich des Keimzentrums zuordnen.

Am Endothel der Zentral- und Follikelarterien wurde sowohl roter als auch brauner Niederschlag nachgewiesen. An den Hülsenkapillaren überwiegt eindeutig das rote Reaktionsprodukt.

3.3 Ultrahistochemische Untersuchung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Das Ergebnis der Untersuchung befand sich in guter Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Befunden.

Die Aktivität im Bereich des Lymphozytenmantels kann auf ultrahistochemischer Ebene an nichtlymphatischen Zellen lokalisiert werden, während die Lymphozyten nicht mitreagieren (Abb. 5).

Die alkalische Phosphatase-positiven Zellen besitzen große, helle Kerne mit ein bis zwei deutlichen Nukleolen. Die Kerne können oval oder auch völlig unregelmäßig geformt sein und sind von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben. Vom Perikaryon aus ziehen Fortsätze in die Peripherie, die sich während ihres Verlaufs zwischen des Mantellymphozyten verzweigen und in ihren terminalen Bereichen ein Gewirr feinsten Fortsätzchen bilden (Abb. 6).

Die positiv reagierenden Zellen, die sich durch die geringe Elektronendichte ihrer Kerne und ihres Zytoplasmas gut von den umgebenden Lymphozyten unterscheiden lassen, sind zum Teil mit extrazellulärem Material vergesellschaftet, welches jedoch an technisch einwandfreien Präparaten frei von Bleiphosphatniederschlägen bleibt. Die Niederschläge sind ausschließlich mit dem äußeren Plasmalemmblatt der nichtlymphatischen Zellen vergesellschaftet (Abb. 7).

Der modifizierte Nachweis nach HUGON und BORGERS ergab innerhalb der Zellen gelegentlich Präzipitate, die an den Cristae der Mitochondrien lokalisiert waren, und die sich in Kontrollinkubationen mit L-p-Bromtetramisol als unspezifisch erwiesen.

In der Grenzzone zwischen Lymphozytenmantel und Marginalzone wird auch ultrahistochemisch keine Enzymaktivität nachgewiesen. In dieser Zone liegen langgestreckte Zellen, die tangential zur Follikeloberfläche orientiert sind. Die positiv reagierenden Fortsätze der nichtlymphatischen Zellen der Mantelzone legen sich diesen Zellen dicht an, ohne daß zu einer Durchsetzung beider Zonen käme.

Im Grenzbereich zwischen dem Follikel einerseits und der PALS andererseits bleibt auch elektronenoptisch ein Bereich frei von Aktivität.

Der lichtmikroskopisch nachweisbaren Keimzentrumsaktivität kann ultrahistochemisch kein Präzipitat zugeordnet werden. Die PALS und die Marginalzonen bleiben entsprechend den lichtoptischen Befunden frei von Aktivität. Alkalische Phosphatase-Aktivität kann nur in den hier lokalisierten Granulozyten nachgewiesen werden.

Die Endothelien der Blutgefäße verhalten sich unterschiedlich. Am Plasmalemm des Endothels von Zentral- und Follikelarterien sind meist nur geringe Mengen Niederschlages anzutreffen, auch das Endothel der Pinselearteriolen markiert sich nicht besonders stark. Aktivität der Hülsekapillarendothelien kann gelegentlich auch Mikropinozytosevesikel des apikalen Zellpols mit einbeziehen.

Die Kapillaren der Marginalzone sowie die sehr spärlichen Kapillaren der weißen Pulpa bleiben grundsätzlich inaktiv.

Eine Spezifitätskontrolle mit L-p-Bromtetramisol im Inkubationsmedium ergibt entsprechend den lichtmikroskopischen Befunden ein Bild vollständiger Hemmung des Substratsatzes.

3.4 Ultrahistochemische Untersuchung der 5'-Nukleotidase-Aktivität

Die 5'-Nase wurde lichtoptisch an Strukturen nachgewiesen, die in der PALS und an der Grenze zwischen Follikel und Marginalzone grobmaschige Netze formen.

Im Bereich der PALS ist die 5'-Nase-Aktivität ultrahistochemisch mit Zellen assoziiert, die mit Hilfe ihrer Fortsätze und des diese begleitenden extrazellulären Materials ein Gerüst aufbauen, in welches die freien Zellen eingelagert sind (Abb. 8).

Unmittelbar auf der äußeren Oberfläche der Zentralarterie

liegen spindelig geformte enzymaktive Zellen in ein- bis zweischichtiger zirkulärer Anordnung. Peripher davon werden mehr sternförmige Zellen gefunden, während an der äußeren Oberfläche der PALS wieder spindelige Zellformen vorherrschen, deren Fortsätze parallel zur Oberfläche der PALS orientiert sind.

Das Reaktionsprodukt ist mit dem Plasmalemm dieser Zellen vergesellschaftet, kann jedoch auch das von den enzymaktiven Zellen eingeschlossene extrazelluläre Material durchsetzen (Abb. 9).

Die Lymphozyten der PALS können in der Nachbarschaft der enzymaktiven Zellen ebenfalls Niederschläge an ihrem Plasmalemm tragen, wobei allerdings der Verdacht naheliegt, daß diese Präzipitate auf dem Diffusionswege an die Zellmembranen der Lymphozyten gelangt sind.

Die für den inneren Bereich der PALS charakteristischen IDZ bleiben inaktiv.

In Übereinstimmung mit den lichtoptischen Befunden findet das Gerüst enzymaktiver Zellen der PALS Anschluß an die 5'-Nase-positive Grenzzone zwischen Follikel und Marginalzone. Peripher des Lymphozytenmantels der Sekundärfollikel wird Aktivität an spindeligen Zellen mit langgestreckten Fortsätzen gefunden, die drei bis fünf konzentrische Schichten um den Follikel bilden (Abb. 10).

Wie schon im Bereich der PALS sind auch diese Zellen mit extrazellulärem Material vergesellschaftet. Das Präzipitat liegt zum einen dem Plasmalemm an und kann zum anderen wieder in unterschiedlicher Stärke dieses extrazelluläre Material überlagern (Abb. 11).

Der Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel bleibt ohne nachweisbare Aktivität. Der lichtoptisch im Bereich des Keimzentrums nachweisbaren Reaktion können ultrahistochemisch keine enzymaktiven Strukturen zugeordnet werden.

Der Bereich der Marginalzone, der sich im Gebiet der Follikel und der PALS peripher an die 5'-Nase-aktiven Zonen anschließt, bleibt frei von Aktivität.

Innerhalb der arteriellen Gefäße ist Aktivität in unterschiedlicher Menge am Endothel nachweisbar, während die übrigen Strukturen der Wand negativ bleiben. Das Endothel der Zentral- und Follikelarterien zeigt vor allem lumenseitig starke Aktivität, wobei sich der Niederschlag hier zu größeren Konglomeraten zusammenlagern kann. Das gleiche Bild ergibt sich auch am Endothel der Pinselarteriole. An den Endothelien der Hülstenkapillaren sind meist nur geringgradige Niederschläge nachweisbar.

Schnitte, die mit dem Substrat 3'-AMP inkubiert wurden, zeigen kein Präzipitat in den für die Spaltung von 5'-AMP typischen Lokalisationen. Dagegen reagieren Granula innerhalb der neutrophilen Granulozyten mit, deren Aktivität auf eine hier noch aktive alkalische Phosphatase zurückzuführen ist.

Ein Vergleich der mit einer reinen Formolfixierung behandelten Präparate mit solchen, die unter Zusatz von 0,1 % Glutaraldehyd fixiert wurden, ergibt eine technische Überlegenheit der Fixierung mit Glutaraldehyd. Neben besserem Gewebeerhalt sind die Präparate insgesamt geringer verschmutzt.

3.5 Elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung

Die Achse der PALS ist die Zentralarterie, eine Arterie muskulären Typs. An ihre aus mehreren Lagen glatter Muskulatur bestehende Tunica media schließt sich ein adventitieller Bereich an, der durch kräftige Bündel kollagener Mikrofibrillen gekennzeichnet ist, die in Längsrichtung und zirkulär verlaufen.

An die Adventitia der Zentralarterie finden langgestreckte Zellfortsätze Anschluß, die zum Gefäß ringförmigen Verlauf nehmen. Die zugehörigen Perikaryen liegen im inneren Bereich der PALS. Andere Fortsätze dieser Perikaryen nehmen Kontakt zu peripher liegenden gleichartigen Zellen und Fortsätzen

auf, sodaß von ihnen ein die gesamte PALS in Form eines Gerüstes durchsetzender Zellverband gebildet wird, in welchen die freien Zellen eingelagert sind.

Die ultrahistochemische Untersuchung der 5'-Nase-Aktivität hat ergeben, daß an diesen Zellen die Enzymaktivität lokalisiert ist; deshalb sollen sie nun einer ultrastrukturellen Untersuchung unterworfen werden.

Die Zellkerne besitzen eine dreieckige oder spindelige Form, wobei auch nicht selten Furchung, Lappung oder Buchtung der Nuklei auftreten. Der größte Teil des Heterochromatins ist marginal kondensiert, gleichzeitig ist in dem übrigen Kernbereich aber auch grobscholliges und feindisperses Heterochromatin eingelagert (Abb. 12). Kann ein Nukleolus nachgewiesen werden, so liegt er im euchromatischen Kernbereich. Er ist peripher stark verdichtet und besitzt eine zentrale Aufhellung. Die Kerne unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Elektronendichte, wobei Zellen mit dunklerem Kern oft auch ein dunkleres Zytoplasma aufweisen.

Von dem schmalen perinukleären Zytoplasmasaum ziehen in verschiedenen Richtungen Fortsätze in die Peripherie, an deren Abgangsstellen eine größere Menge organellenreicher Zytoplasmas gefunden wird (Abb. 12).

Im kernnahen Zytoplasma liegen der gut entwickelte Golgi-Apparat sowie die Zentriolen ebenso wie Profile von rauhem ER, dessen leicht geweitete Zisternen mit wolzig grauer Substanz gefüllt sind. Dunkle osmiophile Einschlüsse mit Hüllmembran und Halobildung lassen sich aufgrund ihrer Gesamtstruktur den Phagolysosomen zuordnen. Ihre Größe beträgt 0,1-0,15 μm .

In den Fortsätzen treten neben einzelnen lysosomalen Einschlüssen auch Vesikel auf, die einen elektronendurchlässigen Inhalt besitzen. Besonders die Fortsätze, aber auch das Grundplasma des Kernbereichs zeichnen sich durch die Einlagerung subplasmalemmal gelegener Filamentbündel aus, die das Zytoplasma dieses Zelltyps elektronendichter als das der umgebenden Lymphozyten erscheinen lassen. Es können

zwei Typen von Filamenten unterschieden werden:

1. Filamente mit einem Durchmesser von 4-5 nm, die einen dichten Filz bilden,
2. von diesen umhüllte dickere Filamente mit einem Durchmesser von 8 nm.

In engem Zusammenhang mit den Bündeln intrazytoplasmatischer Filamente stehen elektronendichte Knoten von faserig-filziger Struktur. Sie gewähren den Filamenten Ansatz; es konnte jedoch nicht beobachtet werden, daß Filamente durch die Knoten hindurchziehen. Den elektronendichten Knoten gleichende Strukturen bilden Anlagerungen an das innere Plasmalemma. Diese dienen spitzwinklig in sie hineinziehenden Filamentbündeln als Verankerung.

Neben den Filamentbündeln beinhalten die Fortsätze auch häufig kurze Profile rauhen ERs.

Während die Länge der Fortsätze aus technischen Gründen nicht ausgemessen werden konnte, ergibt sich für ihre Breite folgendes: Der Durchmesser der basalen Teile der Fortsätze beträgt meist weniger als 0,5 μm . Nach distal verzweigen sich die Fortsätze und erreichen hier Durchmesser von ca. 0,1 μm . In ihrem Verlauf bilden sie kleine nasenartige Ausstülpungen, die auf Fortsätze benachbarter Zellen hinziehen, ohne hier Kontakte herzustellen. Dagegen sind die Fortsätze selbst häufig über Kontakteinrichtungen mit den Fortsätzen benachbarter Zellen verknüpft. An diesen Stellen beträgt die Weite des Interzellularspalt 15-20 nm. Das Grundplasma der beiden Zellen enthält in diesem Bereich einen verdichteten faserigen Bezirk, der Interzellularspalt selbst ist mit dunklem Material angefüllt, ohne daß ein besonders verdichteter Streifen nachweisbar wäre.

An einzelnen Stellen kann beobachtet werden, daß die Plasmalemmata benachbarter Zellen über eine längere Strecke parallel laufen, wobei der elektronendichte Material enthaltende Interzellularspalt eine Weite von 10 nm besitzt und die inneren Plasmalemmablätter eine schmale elektronendichte Auflagerung zeigen.

Die Zellfortsätze begleitend finden sich Stränge extrazellulären Materials, wobei sich im Längsschnitt das Bild einer dreischichtigen Struktur mit der Abfolge Fortsatz - extrazelluläres Material - Fortsatz ergibt. Im Querschnitt sieht man, daß das extrazelluläre Material von den Zellen meist vollständig umhüllt wird. Wo sich die umschließenden Zellen berühren, werden die oben beschriebenen Kontakteinrichtungen ausgebildet. Während im Bereich der Fortsätze relativ schmale Stränge Extrazellulärschubstanz von diesen eingeschlossen werden, sind Stränge größeren Durchmessers vorhanden, die in einer Bucht des Perikaryons liegen.

Das mit den Zellen assoziierte extrazelluläre Material ist aus mehreren Komponenten aufgebaut:

1. Den überwiegenden Anteil bilden kollagene Mikrofibrillen, deren Durchmesser im Bereich von 50 nm liegt. Sie besitzen eine periodische Streifung, die sich in Abständen von 60 nm wiederholt. Diese Mikrofibrillen lassen sich besonders deutlich durch eine Schnittkontrastierung mit Phosphorwolframsäure darstellen. An solchen Präparaten zeigt sich, daß sie sich zu kleinen Bündeln zusammenlagern, die in ihrem Verlauf dem begleitenden Zellfortsatz folgen.
2. Weiterhin kommen kontrastarme Fibrillen vor, die die unregelmäßig-wolkige Struktur von Elastin besitzen. In den Randbereichen ist diesen ca. 150 nm dicken Fibrillen ein Filz elektronendichter Mikrofilamente angelagert.
3. Schließlich werden auch feine Filamente mit einem Durchmesser von ca. 12 nm gefunden, die zu Bündeln zusammengepackt sind und keine periodische Streifung besitzen.
4. Amorphe Substanz mittlerer Elektronendichte ist häufig dem äußeren Plasmalemma angelagert, wobei gleichzeitig meist auch elektronendichte Auflagerungen am inneren Plasmalemma zu beobachten sind. Gleichartiges Material kann auch isoliert erweiterte Interzellularspalten ausfüllen.

Manchmal wird das extrazelluläre Material von kleinen Zellfortsätzchen durchsetzt.

Wie bereits die lichtoptische Untersuchung der PALS ergeben hat, bilden die Lymphozyten den überwiegenden Anteil freier Zellen in diesem Gebiet. Sie zeichnen sich durch runde Kerne mit grobscholliger Chromatinstruktur aus und besitzen nur wenig Zytoplasma. Dieses enthält geringe Mengen rauhen ERs, rundliche Mitochondrien und viele freie Ribosomen. Gelegentlich sieht man auch wandernde Lymphozyten, die eine längliche Form annehmen, wobei der organellenreiche Zytoplasmaleib auf der der Wanderungsrichtung entgegengesetzten Seite liegt. Eine bevorzugte Wanderungsrichtung konnte jedoch nicht ermittelt werden.

Plasmazellen in unterschiedlichen Reifungsstadien sind in der PALS ebenfalls häufig zu finden. Das Heterochromatin in den runden, etwas exzentrisch gelegenen Kernen ist in charakteristischer Weise angeordnet. Ein Saum von an der Kernmembran fixiertem Heterochromatin steht mit dicht kondensierten Bezirken im inneren Kernbereich in Verbindung. Das Zytoplasma enthält gut entwickeltes rauhes ER, dessen Lumen mit enger Lichtung bei sich entwickelnden Zellen bis zu starker Auftreibung bei älteren Formen reicht. Des weiteren sind auch neutrophile und eosinophile Granulozyten in der PALS vorhanden, wobei letztere durch ihre großen osmiophilen Einschlüsse auffallen.

Die Zahl der Erythrozyten nimmt in der PALS nach außen hin zu. Sie können in den peripheren Bereichen das Maschenwerk gerüstbildender Zellen fast vollständig ausfüllen. Gelegentlich sieht man auch von Makrophagen aufgenommene Erythrozyten. Die Makrophagen besitzen große, helle Kerne und ein voluminöses Zytoplasma, welches dunkle Einschlüsse unterschiedlicher Größe enthält.

Die für die zentrale PALS charakteristischen IDZ wurden bereits von BADER (1981) genau beschrieben, sodaß dieser Zelltyp hier nicht noch einmal besprochen werden soll.

Während die 5'-Nase-positiven Zellen der PALS vorwiegend sternförmige Gestalt besitzen, zeigen die enzymaktiven Zellen der Follikelperipherie spindelige Form (Abb. 13). An Stellen, an denen der PALS ein Follikel aufsitzt, treten Übergangsformen zwischen beiden Typen auf. Die gerüstbildenden Zellen der PALS orientieren sich in diesen Bereichen zur Follikeloberfläche hin, wo mehrere parallele Reihen spindelliger Zellen lokalisiert sind. Diese stehen durch spitzwinklig aufeinandertreffende Fortsätze untereinander in Verbindung und bilden damit ein Netz mit langgestreckten Maschen, in das wiederum freie Zellen eingelagert sind.

Die Kerne der im Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone liegenden 5'-Nase-positiven Zellen sind sehr langgestreckt, schmal und spindelig (Abb. 13). Das Zytoplasma ist entsprechend der Kernform bipolar verteilt, wobei sich der größte Teil der Organellen an den Zellpolen befindet (Abb. 14). Wie schon in den gerüstbildenden Zellen der PALS, wird auch hier leicht geweitetes rauhes ER nachgewiesen, dessen Zisternen einen Durchmesser von ca. 0,5 μm besitzen. Die rundlichen, im Bereich der Fortsätze jedoch langgestreckten Mitochondrien weisen quer oder transversal gerichtete Cristae auf. Am Zellpol oder in dessen Nähe, an der Lateralseite des Kerns, liegt der gut entwickelte Golgi-Apparat (Abb. 14). Seine konkave Seite wird von zahlreichen Vesikeln mit einem Inhalt mittlerer Elektronendichte ausgefüllt. Diese erreichen einen Durchmesser von ca. 50 nm. Stachelsaumvesikel und Mikrotubuli mit einem Durchmesser von 20 nm werden regelmäßig in der Nähe des Golgi-Apparates gefunden. Ebenfalls in dieser Region können auch multivesikuläre Körperchen liegen, deren Vesikel einen Durchmesser von 30-40 nm besitzen.

Wie in den 5'-Nase-positiven Zellen der PALS werden auch hier im Bereich des Perikaryons und der Fortsätze einzeln liegende Phagolysosomen gefunden, bei denen neben runden Formen auch langgestreckte und Hantelformen vorkommen (Abb. 14). Große Vakuolen werden in den Fortsätzen häufiger als

in Kernnähe gesehen.

Die Lateralseiten des Kerns werden von Bündeln subplasmalem mal gelegener Mikrofilamente entweder nur einseitig oder auch beidseitig umzogen (Abb. 14). Eng dem Plasmalemm anliegend umgehen diese Bündel den organellenreichen Zellpol, um dann in die Fortsätze einzutreten (Abb. 15). Gelegentlich werden hier zwischen den Filamenten auch Mikrotubuli gefunden. Wie in den gerüstbildenden Zellen der PALS stehen die Mikrofilamentbündel in Beziehung zu elektronendichten Knoten und gleichartigen Anlagerungen des inneren Plasmalemmblattes (Abb. 14 und 15).

Die bei diesen Zellen nur an den Polen abgehenden Fortsätze bilden Kontakte mit Fortsätzen angrenzender Zellen aus, die den für die Zellen der PALS beschriebenen gleichen (Abb. 15).

Die von den spindelförmigen Zellen eingeschlossene Extrazellulärsubstanz gleicht in ihrem Aufbau ebenfalls der im Bereich der PALS beschriebenen; Überwiegend sind kollagene Mikro-fibrillen mit einer Dicke von 50 nm und periodischer Streifung vorhanden, aber auch die 150 nm dicken wolfig strukturierten Fibrillen sowie Büschel feinsten Filamente fehlen nicht (Abb. 14). In Begleitung dieser Komponenten des extrazellulären Materials, aber auch isoliert in erweiterten Interzellularspalten findet sich amorphes Material mittlerer Elektronendichte (Abb. 15). Eine enge Beziehung zwischen dem Plasmalemm der 5'-Naße-positiven Zellen und dem extrazellulären Material besteht in Bereichen, in denen am inneren Plasmalemmblatt eine Auflagerung nachweisbar ist, während von der Außenseite feinste Fäserchen, direkt aus der nächsten Umgebung kommend, auf diesen Bereich hinziehen.

In das von den Zellen gebildete Gerüst sind wiederum Lymphozyten und Plasmazellen eingelagert, während Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten erst peripher dieser Zone auftreten.

Glatte Muskelzellen werden an der äußeren Grenze dieses Bereichs zirkulär geschichteter gerüstbildender Zellen gefunden (Abb. 16). Sie besitzen strukturelle Ähnlichkeiten mit

diesen, zum einen durch die Form, zum anderen auch durch die Einlagerung intrazytoplasmatischer Mikrofilamente sowie elektronendichter Knoten und gleichartiger Anlagerungen an das Plasmalemm. Jedoch sind diese Strukturen in den glatten Muskelzellen zahlreicher vertreten, sodaß eine Verwechslung beider Zelltypen nicht möglich ist.

Kapillaren, die schon in der PALS nur in den äußersten Bereichen anzutreffen waren, können in der 5'-Nase-positiven Zone zwischen Follikel und Marginalzone ebenfalls nur selten nachgewiesen werden; die Kapillaren der Marginalzone lassen sich nur bis an diese Zone verfolgen.

Zentral schließt sich an das Gebiet der 5'-Nase-Aktivität im Follikelbereich der Lymphozytenmantel an. Dieser ist von kleinen Lymphozyten besiedelt sowie von hellen Zellen mit charakteristisch ausgebildeten Fortsätzen. Da es sich bei ihnen um die alkalische Phosphatase-positiven Zellen handelt, soll nun die feinstrukturelle Beschreibung der hellen Zellen durchgeführt werden.

Die Kerne dieser Zellen (Abb. 17) sind größer als die der Lymphozyten. Wie bereits beschrieben, treten sehr verschiedene Kernformen auf, in denen das spärliche Heterochromatin der Kernmembran als schmaler Saum angelagert ist. Es werden jedoch auch kleinere Schollen und feine Granula von Heterochromatin innerhalb des Kerns nachgewiesen. Zentral liegt der große Nukleolus, der mehrere Aufhellungen besitzen kann. Das Zytoplasma umgibt den Kern als schmaler Saum. Größere Mengen werden nur in Bereichen gefunden, in denen Fortsätze von dem perinukleären Gebiet abstrahlen. Häufig ist der Abgang eines Fortsatzes mit einer Vorwölbung des Nukleus korreliert. In diesem Gebiet liegen auch besonders viele Zellorganellen.

Der Golgi-Apparat befindet sich an der Lateralfläche des Kerns oder an der Abgangsstelle eines Fortsatzes; in seiner Nähe liegen meist auch die Zentriolen. Die Form des Golgi-

Apparates ist unterschiedlich. Neben langen, schmalen Formen werden auch dickere, leicht geweitete Säckchenstapel angetroffen, deren Inhalt geringgradig elektronendichter als das Grundplasma der Zellen ist. Vesikulation tritt sowohl an der konkaven als auch an der konvexen Seite des Golgi-Apparates auf. Neben Vesikeln mit einem Durchmesser von ca. 50 nm, die einen homogenen Inhalt mittlerer Elektronendichte aufweisen, sind in geringerer Menge auch Stachelsaumvesikel vorhanden. Zwischen den Vesikeln ziehen regelmäßig Mikrotubuli entlang.

Das rauhe ER ist gut ausgebildet. In Kernnähe befinden sich viele geweitete Zisternen, die mit wolkig-grauer Substanz gefüllt sind. Innerhalb der Fortsätze werden kurze Profile des rauhen ER gesehen (Abb. 18). Freie Ribosomen und Polysomen treten nur in einzelnen Bereichen der Zelle auf.

Osmiophile Einschlüsse mit Halobildung und Hüllmembran werden regelmäßig angetroffen, ebenso auch - wie schon in den 5'-Nase-positiven Zellen-multivesikuläre Körperchen.

Subplasmalemmal können bei einzelnen Zellen im Bereich der Fortsätze Vakuolen mit einem Durchmesser von 0,2-0,3 μ m vorkommen, die sich in Gruppen zusammenlagern. Einzelne Vakuolen sind in das Plasmalemm eingebaut.

Verfolgt man den Verlauf der von den Zellen ausgehenden Fortsätze zwischen den Mantellymphozyten, zeigt sich, daß sich die Fortsätze verjüngen, aber auch erneut an Stärke zunehmen können. In ihrem hellen Grundplasma liegen Filamente (Abb. 15), die ca. 5 nm dick sind und meist parallel zur Längsachse der Fortsätze verlaufen. Gleichartige Filamente treten auch im perinukleären Bereich auf, wo sie ungeordnet das Grundplasma durchziehen. Innerhalb der Fortsätze finden sie Anschluß an verdichtete knotige Strukturen und gleichartige Auflagerungen des inneren Plasmalemmblattes, können jedoch auch am unveränderten Plasmalemm inserieren (Abb. 18 und 21). Die elektronendichten Knoten gleichen jenen innerhalb der Zellen der PALS und der Follikelperipherie, sind jedoch in den Zellen des Lymphozytenmantels nicht so zahlreich und

besitzen auch geringere Dichte.

Die Zellfortsätze verzweigen sich stark und schließen die Mantellymphozyten netzartig ein. Feinste Fortsätze (Abb. 19) mit einem Durchmesser von 0,1-0,3 μm liegen häufig nestartig beieinander; auch in ihnen sind noch Filamente nachweisbar.

Zellkontakte werden unter den Fortsätzen der hellen Zellen (Abb. 19 und 20) sowie zwischen Perikaryen und Fortsätzen (Abb. 21) ausgebildet. Zu den Kontaktstellen ziehen aus dem Zytoplasma der beteiligten Zellen Filamente hin (Abb. 20) und bilden hier einen stark verdichteten Bereich. Der Interzellularspalt ist 15-20 nm breit und enthält elektronendichtes Material. Eine lineare Verdichtung des Materials im Interzellularspalt wird nicht beobachtet.

Extrazelluläres Material kann in der Nachbarschaft des Perikaryons (Abb. 17) oder größerer Fortsätze (Abb. 22) auftreten und wird meist vollständig von den Zellen umhüllt.

In seiner Zusammensetzung entspricht es dem extrazellulären Material, welches an der Grenzzone zwischen Follikel und Marginalzone auftritt, jedoch sind hier elastische Fasern schmaler und nicht so häufig (Abb. 22). Direkt dem Plasmalemm anliegend wird häufig amorphes Material gefunden, welches auch isoliert erweiterte Interzellularspalten ausfüllen kann (Abb. 21). Innerhalb dieser Substanz werden gelegentlich Körperchen gesehen, die an Viren erinnern (Abb. 18).

Feinste Zellfortsätze, deren Durchmesser unter 0,1 μm liegt, können die Extrazellulärsubstanz durchsetzen.

Häufig werden hemidesmosomenartige Bereiche gefunden, wo die Zellen mit dem extrazellulären Material in Beziehung treten (Abb. 22). Der zur Zelle gehörige Bereich der Kontaktstelle erinnert an die Bildungen, die beim Kontakt zweier Zellen untereinander beobachtet werden. Dem steht im extrazellulären Bereich eine faserige graue Auflagerung an das äußere Plasmalemmblatt gegenüber.

3.6 Aufeinanderfolgende Darstellung IgM-tragender Lymphozyten mit der Immunfluoreszenzmethode nach GUTMAN und WEISSMAN und der 5'-Nukleotidase nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER an demselben Schnitt

Diese Nachweistechiken wurden durchgeführt, um Anhaltspunkte für die Zuordnung der 5'-Nase-positiven Zone im Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone zu einem der Kompartimente der weißen Pulpa der Milz zu erhalten.

Es ergibt sich im follikulären Bereich folgendes Bild:

In den Keimzentren der Sekundärfollikel ist Fluoreszenz an linearen Strukturen nachweisbar, sowie am Plasmalemm oder im Zytoplasma runder Zellen (Abb. 23). Die Lymphozytenmäntel der Sekundärfollikel stellen sich als Gebiete dar, die dicht mit Lymphozyten besiedelt sind, deren Plasmalemm stark fluoresziert (Abb. 23).

Wie der 5'-Nase-Nachweis nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER zeigt, schließt sich peripher an den Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel die Zone der 5'-Nase-Aktivität an. Durch Vergleich eines Fotos des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises mit einem Foto des enzymhistochemischen Nachweises konnte die Enzymaktivität einem Bereich an der Follikelperipherie zugeordnet werden (Abb. 23 und 24 sowie Abb. 25 und 26), der sich fluoreszenzmikroskopisch folgendermaßen darstellt:

Lineare Strukturen, deren Fluoreszenz sich an Kontrollschnitten als unspezifisch herausgestellt hat, sind hier tangential zur Follikeloberfläche ausgerichtet und bilden dabei mehrere parallele Reihen. Zwischen diesen bleiben Zwischenräume frei, in denen sich unterschiedlich reagierende Zellen befinden (Abb. 25). Dies sind einerseits Zellen, die keine Fluoreszenz am Plasmalemm erkennen lassen, andererseits Zellen, deren Plasmalemm fluoresziert, sowie einzelne Zellen mit zytoplasmatischer Fluoreszenz.

Auch das peripher davon liegende Gebiet der Marginalzone enthält Zellen, an deren Plasmalemm sich fluoreszenzmikroskopisch IgM nachweisen läßt, sowie Zellen mit zytoplasmatischer

Fluoreszenz. Letztere treten vermehrt im Grenzgebiet zwischen roter Pulpa und Marginalzone auf, welches ebenfalls an Hand der 5'-Nase-Aktivität zugeordnet werden konnte.

4. Diskussion

Die weiße Pulpa der Schweinemilz stellt eine zonal gegliederte Assoziation spezifischer Subpopulationen von Lymphozyten mit nichtlymphatischen akzessorischen Zellen und extrazellulärem Material dar. Histotopochemische Studien der Aktivitätsmuster von alkalischer Phosphatase, 5'-Nase und Mg^{2+} -Adenosintriphosphatase an der Schweinemilz ergaben im Bereich der Sekundärfollikel drei einander konzentrisch umschließende Aktivitätszonen. Die alkalische Phosphatase- und 5'-Nase-Aktivität konnten bisher zytologisch nicht zugeordnet werden, wenn auch das lichtmikroskopische Verteilungsmuster die Lokalisation dieser Enzymaktivitäten an nichtlymphatischen Zellen nahelegte (BADER 1981).

Im folgenden werden zunächst die verwendeten Nachweismedien hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit, der Spezifität und der Lokalisationstreue besprochen. Das Schwergewicht der Methodenkritik liegt beim Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität, weil ihre Darstellung mit besonderen technischen Schwierigkeiten verbunden war. Anschließend wird versucht, die enzymaktiven Zellen zytologisch einzuordnen, und schließlich werden die dargestellten Enzymaktivitätsmuster der weißen Milzpulpa des Schweines mit denen anderer Spezies verglichen und die Probleme ihrer funktionellen Bedeutung aufgezeigt.

Als Haupthindernis für den ultrahistochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität erweist sich die geringe Ausgangsaktivität in der Milz des Schweines, weswegen nach vielen Versuchen überhaupt kein Reaktionsprodukt in semi- und ultradünnen Schnitten wiedergefunden werden konnte. Ein Vergleich der Angaben in der Literatur zur biochemisch bestimmten Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase in verschiedenen Organen des Schweines zeigt, daß in Nierenhomogenaten 13 bis 14 mal höhere, in Leberhomogenaten immer-

hin noch 2 mal höhere Umsatzraten von Phenylphosphat gemessen werden als in Milzhomogenaten (MC COMB et al. 1979). Diese Ergebnisse erklären die histochemischen Beobachtungen, wie sie insbesondere auch mit vergleichbaren aromatischen Phosphorsäureestern als Substraten zu erheben sind.

Über die geringe Ausgangsaktivität hinaus muß noch mit Aktivitätsverlusten während der Präparationsschritte gerechnet werden. Vor allem durch die Fixierung wird ein erheblicher Teil der vorhandenen alkalischen Phosphatase-Aktivität gehemmt. Auf eine Fixierung des Gewebes vollständig zu verzichten, ist aber bei ultrahistochemischen Nachweisen wegen der dann katastrophal schlechten Strukturerhaltung nicht zu empfehlen. Es mußte deshalb nach einem Kompromiß zwischen einer erträglichen Strukturerhaltung einerseits und möglichst geringen Aktivitätsverlusten andererseits gesucht werden. Eine Fixierung mit 0,1 % Glutaraldehyd und 4 % Formaldehyd in Cacodylatpuffer erwies sich als günstigstes Vorgehen. Mit einer Kombination von Formaldehyd und Glutaraldehyd läßt sich nach DAVIES und GARRETT (1973) auch eine besonders gute Strukturerhaltung des Gewebes erzielen.

Um die nach der Fixierung verbliebene Restaktivität vollständig zu erfassen, empfiehlt sich der Einsatz von Inkubationsmedien, die selbst möglichst geringe Hemmwirkung auf das Enzym ausüben. Das von GOMORI (1952) vorgeschlagene Medium würde sich hier anbieten, da es keine Schwermetallionen enthält, deren inhibitorische Wirkung auf die alkalische Phosphatase bekannt ist (MATHIES 1958, MAYAHARA et al. 1967). Die GOMORI-Technik erfordert aber zwei Reaktionsschritte, was eine unscharfe Lokalisation des Nachweisproduktes zur Folge hat. Es wurden deshalb verschiedene Medien für einstufige Techniken untersucht, die Bleiionen zur Fällung der freigesetzten Phosphationen enthalten.

Lichtmikroskopische Vorversuche ergaben erwartungsgemäß eine hohe Empfindlichkeit von Medien, die nur geringe Bleikonzentrationen aufweisen. Inkubationsmedien, die zusätzliche Chelatbildner enthalten, erwiesen sich als weniger empfind-

lich, da sie offenbar mit den Zinkionen des Enzyms interferieren.

HUGON und BORGERS (1966) entwickelten ein Medium, das bei niedriger Bleiionenkonzentration ohne zusätzlichen Komplexbildner arbeitet. Als Nachteil mußten sie hierfür eine geringe Stabilität in Kauf nehmen. Das Medium per se eignet sich deshalb nur für Material mit hoher Ausgangsaktivität, bei dem sehr kurze Inkubationszeiten ausreichen. Es wurde daher versucht, dieses Medium der Notwendigkeit einer längeren Inkubationsdauer anzupassen. Das für den Ansatz verwendete destillierte Wasser wurde zusätzlich vor Gebrauch nochmals abgekocht, um die Bildung von Bleicarbonat zu verhindern, welches sich bei hohen pH-Werten bildet und zu unlöslichen Niederschlägen führt (DEIMLING 1964). Durch Gelatine-Zusatz und Anwendung des schon von HUGON und BORGERS (1966) vorgeschlagenen niedrigeren pHs von 8,2 konnte die Stabilität des Mediums erhöht und die bei dem Originalmedium nach kurzer Zeit auftretenden Präzipitate vermieden werden. Auf diese Weise wurden für den ultrahistochemischen Nachweis reproduzierbare Ergebnisse erzielt, ohne daß es zu stärkeren Verschmutzungen während der Inkubation kam.

Bei der Entwässerung des derart vorbereiteten Gewebes muß mit besonderer Vorsicht gearbeitet werden, um Verluste von Reaktionsprodukt zu vermeiden. Die für die elektronenmikroskopisch-histologische Untersuchung durchgeführte Blockkontrastierung nach KARNOVSKY sowie der dazu erforderliche Maleat-Spülpuffer arbeiten bei pH 5,2, bei welchem die Gefahr einer Lösung des Nachweisproduktes Bleiphosphat aus dem Präparat besteht. In den meisten Fällen wurde daher auf die Blockkontrastierung verzichtet. Nach der Inkubation wurde zunächst mit Na-Cacodylat-Spülpuffer bei pH 7,4 und dann mit s-Collidinpuffer nach BENNETT und LUFT (1959) gespült, der bei einem pH von 7,4 keine Lösung des Bleiphosphates aus dem Präparat nach sich zieht. Daneben soll dieser Puffer nach KNYIHAR-CSILLIK und CSILLIK (1981) eine Wirkung be-

sitzen, die der des Ammoniumsulfids auf lichtmikroskopischer Ebene vergleichbar ist und das Reaktionsprodukt stabilisiert.

Hinsichtlich der Spezifität des Nachweises müssen zwei Fragen diskutiert werden:

1. Spielen Metallionen als Katalysatoren einer nichtenzymatischen Substrathydrolyse eine Rolle?
2. Welche Enzymaktivität wurde dargestellt?

Gegen eine metallionenkatalysierte Substratspaltung, wie sie etwa für Nukleosidtriphosphate nachgewiesen wurde (GANO-TE et al. 1969), spricht, daß lichtmikroskopisch die Azofarbstoffmethode, die auf einem anderen Reaktionsmechanismus beruht, das gleiche Verteilungsmuster des Reaktionsproduktes ergibt. Ferner ist aus Messungen bekannt, daß die Hydrolyse von Esterbindungen wesentlich weniger stark durch Metallionen katalysiert wird, als die Spaltung von Pyrophosphatbindungen. Es kann also davon ausgegangen werden, daß das beobachtete Reaktionsprodukt seine Entstehung einer enzymatisch katalysierten Hydrolyse verdankt.

Als Argument für den Nachweis einer alkalischen Phosphatase können die durchgeführten Hemmversuche herangezogen werden. Das von BORGERS und THONE (1975) eingeführte L-p-Bromtetramisol gilt als spezifischer Inhibitor alkalischer Phosphatasen mit Ausnahme des am Bürstensaum des Dünndarmepithels vorkommenden Enzyms. Diese Substanz wurde in Kontrollversuchen allen Nachweismedien zugesetzt und bewirkte eine vollständige Hemmung der Reaktion. Für die Spezifität der Hemmung spricht, daß das D-p-Bromtetramisol keine inhibitorische Wirkung zeigte. Daneben wurden Kontrollen in substratfreiem Medium durchgeführt, um unspezifische Adsorption von Bleionen an Gewebestrukturen oder die Fällung natürlicher Phosphate in den Schnitten auszuschließen. Diese Versuche ergaben keine Hinweise auf falsch positive Ergebnisse. Die Spezifitätskontrolle unter Verwendung von Cystein beruht auf der komplexen Bindung der für die Enzymkatalyse

benötigten Zinkionen. Obwohl diese Versuche positiv im Sinne einer Hemmung der Reaktion verliefen, ist hier eine Interferenz mit den zur Fällung der freigesetzten Phosphationen erforderlichen Bleitionen nicht auszuschließen.

Die Einwirkung von Wärme in Verbindung mit starker Aldehydfixierung führte ebenfalls zu einer Inaktivierung des Enzyms. Diese Kontrolle ist jedoch wenig spezifisch.

Eine reine Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde nicht vorgenommen, da Bedenken gegen diese Art von Spezifitätskontrolle aufgekommen sind (KLAUSHOFER und VON MAYERSBACH 1977). Besonders die Inaktivierung mit feuchter Hitze beeinträchtigt die gesamte Gewebestruktur derart, daß aus dem negativen Ausfall der Enzymreaktion keine Rückschlüsse mehr gezogen werden können, ob überhaupt Enzymkatalyse an der untersuchten Reaktion beteiligt war. Die Autoren belegen ihre Vorbehalte gegen diesen "Spezifitätsnachweis" von Enzymreaktionen mit der Beobachtung, daß mit feuchter Hitze vorbehandelte Schnitte nicht einmal mehr mit Hämatoxylin oder Methylgrün-Pyronin angefärbt werden können. Dies beruht wahrscheinlich auf einer so starken Denaturierung der molekularen Komponenten der Zellen, daß sogar ihre Fähigkeit zu Adsorption der Farbstoffmoleküle verloren geht (KLAUSHOFER und VON MAYERSBACH 1977).

Aus den Ergebnissen der diskutierten Kontrollen kann der Schluß gezogen werden, daß mit der modifizierten Bleisalz-methode nach HUGON und BORGERS (1966) die Aktivität einer oder mehrerer alkalischer Phosphatasen dargestellt wurde.

Für histotopochemische Zwecke muß ferner die Ortsrichtigkeit des nachgewiesenen Reaktionsproduktes betrachtet werden, d.h. die Frage, ob die elektronenmikroskopisch gefundenen Bleipräzipitate mit der Lokalisation der alkalischen Phosphatase übereinstimmen. Diffusions- und Adsorptions-artefakte können durch Verlagerung des Enzyms selbst oder durch Umlagerung seiner Reaktionsprodukte während der enzymatischen Reaktion entstehen. Zusätzlich könnten während

der Arbeitsgänge im Laufe des Einbettungsverfahrens Umlagerungen des Reaktionsproduktes erfolgen.

Auch fest an das Plasmalemm gebundene Enzyme, wie die alkalische Phosphatase, können umgelagert werden, wie experimentelle Untersuchungen ergeben haben (HARDONK et al. 1977). Danach führt besonders die Behandlung des Gewebes mit Na-Cacodylatpuffer oder Collidinpuffer zu einer partiellen Lösung der Enzymmoleküle, die anschließend an andere Strukturen wieder gebunden werden können. Dieses Problem kann jedoch hier vernachlässigt werden, da sich die Freisetzung von Enzymmolekülen durch Fixierung des Gewebes mit Aldehyden, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, unterdrücken läßt.

Für die Ortsrichtigkeit des nachgewiesenen Reaktionsproduktes spricht, daß sowohl die Azofarbstoffmethode nach STUTTE (1967) als auch die Bleisalzmethoden auf lichtmikroskopischer Ebene zu identischen Lokalisationen an bestimmten Gefäßendothelien und an linearen Strukturen im Bereich des Lymphozytenmantels der Sekundärfollikel führten. Das Gebiet der Enzymaktivität erscheint dabei scharf begrenzt ohne Diffusionshöfe von Reaktionsprodukt.

Bei der Argumentation auf feinstruktureller Ebene kann man nicht auf Vergleiche mit der Azofarbstoffmethode zurückgreifen, da deren Reaktionsprodukt nicht elektronendicht ist und außerdem durch organische Lösungsmittel extrahiert wird.

Die Beobachtung, daß die Bleiprazipitate immer den Perikaryen und Fortsätzen eines bestimmten nichtlymphatischen Zelltyps zugeordnet werden können und hier mit dem äußeren Plasmalemmblatt assoziiert sind, spricht jedoch für die Fällung der Phosphationen am Ort ihrer Entstehung. Hiermit befindet sich die aus biochemischen Untersuchungen bekannte Tatsache in Übereinstimmung, daß die alkalische Phosphatase ihre katalytische Aktivität in den extrazellulären Raum hinein entfaltet. Die Lymphozyten in der Umgebung dieser Zellen reagieren meist eindeutig negativ. Nur dort, wo beide Zelltypen dicht benachbart liegen, ist aufgrund von Diffusion

innerhalb des Interzellularraumes eine Lokalisation am Plasmalemm von Lymphozyten nachweisbar. Damit ist gleichzeitig die Grenze des Auflösungsvermögens dieser Technik unter optimalen Bedingungen gegeben.

Einen Indikator für die Lokalisationstreue stellt auch die Kernverschmutzung der Präparate dar. Diese tritt besonders bei niedriger Bleiionenkonzentration der Medien auf. Die Kerne konzentrieren aufgrund ihrer negativen Ladungen zweiwertige Kationen, wodurch das übrige Medium an diesen Ionen verarmt. Dadurch werden die Phosphationen nicht am Ort der Substrathydrolyse, sondern nach Diffusion in die Kernbereiche gefällt. Hier wurden in den Kernen nur selten derartige Ablagerungen gefunden.

Da auch Kontrastierungen, besonders Nachkontrastierungen mit Phosphorwolframsäure, Bleicitrat oder Uranylacetat, elektronendichte Niederschläge in den Präparaten entstehen lassen können, wurde zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse auf diese Kontrastierungen für die ultrahistochemischen Nachweise meist verzichtet.

Auch die histochemisch erfaßbare Aktivität der 5'-Nase in der weißen Milzpulpa ist, verglichen mit der in verschiedenen Organen von Ratte und Maus gefundenen (HARDONK 1968), sehr gering. Jedoch zeigen hier die zum Nachweis verwendeten Inkubationsmedien bei den erforderlichen langen Inkubationsdauern eine gute Stabilität. Eine Ausnahme bildete der Nachweis nach YAMASHINA und KAWAI (1981), der anstelle des in den übrigen Medien verwendeten Tris-Maleatpuffers Na-Cacodylatpuffer benutzt. Zudem liegt die Bleiionenkonzentration bei nur 1,8 mM, worauf wahrscheinlich die bei diesem Nachweis entstehenden Präzipitate im Kernbereich zurückzuführen sind.

Von besonderer Bedeutung für die Spezifität dieser Technik ist die Frage, welche Enzyme den Umsatz des Substrates Adenosin-5'-monophosphat katalysieren.

Als Nachweis für die Beteiligung einer 5'-Nase am Substrat-

umsatz kann ein Vergleich der Spaltung von Adenosin-5'-monophosphat, Adenosin-3'-monophosphat und Glycerin-2-phosphat herangezogen werden, weil 5'-Nasen spezifisch 5'-Nukleotide umsetzen (HEPPEL 1961). Da unter sonst übereinstimmenden Bedingungen nur Adenosin-5'-monophosphat hydrolysiert wurde, darf auf die Wirkung einer spezifischen 5'-Nase geschlossen werden.

Ferner war zu prüfen, ob alkalische Phosphatasen einen Einfluß auf die Spaltung von Adenosin-5'-monophosphat hatten. Diese Enzymgruppe kann auch bei pH 7,2 noch Restaktivität zeigen und setzt sehr unterschiedliche Substrate unspezifisch um. Der Zusatz von L-p-Bromtetramisol zu dem Adenosin-5'-monophosphat enthaltenden Medium führte jedoch nicht zu einer Hemmung der Reaktion, wodurch eine Interferenz der alkalischen Phosphatasen ausgeschlossen werden konnte. Als weiteres Argument gegen einen Einfluß alkalischer Phosphatasen auf den Nachweis der 5'-Nase läßt sich das völlig unterschiedliche Verteilungsmuster der beiden Aktivitäten anführen.

Ein falsch positives Ergebnis, welches nicht durch die Spaltung von Adenosin-5'-monophosphat bedingt, sondern durch unspezifische Adsorption von Bleiionen im Gewebe entstanden ist, kann durch die Inkubation von Kontrollen in substratfreiem Medium ausgeschlossen werden. Hier wurde ein vollständig negatives Ergebnis erzielt. Eine durch Bleiionen katalysierte unspezifische Hydrolyse von Adenosin-5'-monophosphat oder Adenosin-3'-monophosphat, wie sie von GANOTE et al. (1969) für den Nachweis von Nukleosiddi- und -triphosphatasen beschrieben wurde, ist hier aus dem bereits oben erwähnten Grund ebenfalls ohne Bedeutung.

Von dem spezifischen Inhibitor Adenosin- α - β -methylen-diphosphat (BURGER und LOWENSTEIN 1970, 1975) stand nur eine so geringe Menge zur Verfügung, daß aus diesen Beobachtungen keine Rückschlüsse gezogen werden können.

Die Beurteilung der Lokalisationstreue gestaltet sich schwie-

riger als die der alkalischen Phosphatase-Aktivität, da für dieses Enzym nur Metallsalztechniken, aber keine Azofarbstoff- oder sonst unabhängigen Methoden für einen Vergleich zur Verfügung stehen.

Es hat sich gezeigt, daß Präzipitat im Kernbereich nur in geringem Umfang nachzuweisen ist, jedoch besitzt der Niederschlag eine starke Tendenz, sich an extrazelluläre Fasern anzulagern, die stets in Begleitung der enzymaktiven Zellen auftreten, sodaß das Auflösungsvermögen dieser Technik auf ultrahistochemischem Niveau etwas schlechter ist, als beim Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität.

Vor einer Diskussion der feinstrukturellen und ultrahistochemischen Befunde stellt sich zunächst die Aufgabe, die beiden enzymaktiven Zonen topographisch zuzuordnen. Dabei bereitet die Lokalisation der alkalischen Phosphatase-positiven Zone keine besonderen Schwierigkeiten. An Hand von Kryostat- und Semidünnschnitten, die alternierend mit Ammoniumsulfid und Methylenblau behandelt werden, kann gezeigt werden, daß sich diese Enzymaktivität auf den Bereich des Lymphozytenmantels (Fig. 1; LMZ) der Sekundärfollikel beschränkt und hier mit nichtlymphatischen Zellen vergesellschaftet ist. Dieses Gebiet stellt, wie der fluoreszenzmikroskopische Nachweis nach GUTMAN und WEISSMAN (1972) zeigt, ein Areal dar, in dem ein Teil der B-Lymphozyten der weißen Pulpa angesiedelt ist.

Peripher an den Lymphozytenmantel schließt sich im follikulären Bereich die Zone der 5'-Nase-Aktivität an (Fig. 1; 5'-Nase-pos. Zone), die mit den 5'-Nase-positiven Strukturen der PALS (Fig. 1; PALS) in Verbindung steht. Sie ist, wie an Doppelinkubationen von alkalischer Phosphatase und 5'-Nase deutlich wird, gut gegen das Gebiet des Lymphozytenmantels abgesetzt. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab, daß die Enzymaktivität hier an faserassoziierten nichtlymphatischen Zellen lokalisiert ist, die an der

Follikelperipherie mehrere konzentrische Lagen bilden. Diese, durch ihre 5'-Nase-Aktivität charakterisierten Zellen bauen ein Grundgerüst für eine Population von freien Zellen auf, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie fast ausschließlich aus Lymphozyten und einigen Plasmazellen zusammengesetzt ist und fast nie Granulozyten und Erythrozyten enthält. Dieser Bereich ist äußerst schwach vaskularisiert.

Es müssen folgende Möglichkeiten für eine Zuordnung der 5'-Nase-positiven Zone im perifollikulären Bereich in Betracht gezogen werden:

1. Die Zone der 5'-Nase-Aktivität stellt einen äußeren Bezirk des Follikels dar.
2. Es handelt sich bei der fraglichen Zone um den inneren Bereich der Marginalzone.
3. Die Zone der 5'-Nase-Aktivität bildet eine Fortsetzung der PALS auf die Oberfläche des Follikels.
4. Es handelt sich um eine selbständige Zone, die keinem der oben genannten Kompartimente angehört.

Eine besondere Schwierigkeit für die Zuordnung der 5'-Nase-positiven Zone ergibt sich aus der Tatsache, daß das Übergangsgebiet zwischen roter und weißer Pulpa keinen eindeutig definierten Bereich darstellt.

Dieses Gebiet wurde bereits von WEIDENREICH (1901) als eigenständige Bildung in der Milz des Menschen erkannt und mit dem Begriff "Knötchenrandzone" bezeichnet. Spätere Autoren konnten die Existenz dieses Gebietes für verschiedene Säugetierspezies bestätigen. KRUMBHAAR (1948) beschrieb es in der Rattenmilz als "perifollicular envelope", BAILIFF (1953) ebenfalls für die Rattenmilz als "white pulp halo". Der von SNOOK (1950) in einer vergleichenden Studie geprägte Begriff "marginal zone" hat sich im Schrifttum weitgehend durchgesetzt. Obwohl dieses Gebiet seit langem bekannt ist, liegen überraschender Weise erst aus den letzten

Jahren eingehendere Untersuchungen zu seinem Bau vor.

SAITOH und KAMIYAMA (1978), TAKASAKI (1979) und SAITOH et al. (1982) haben eine in den Grundzügen übereinstimmende Beschreibung dieses Gebietes für die Milz des Menschen gegeben (Fig. 2). Diese Autoren unterscheiden das Grenzgebiet zwischen Follikeln und roter Pulpa einerseits und zwischen PALS und roter Pulpa andererseits. Im perifollikulären Grenzgebiet lassen sich drei Bereiche differenzieren: An den Lymphozytenmantel (Fig. 2; LMZ) schließt sich zunächst eine helle Zone an (Fig. 2; HIZ), die zahlreiche runde, mittelgroße Lymphozyten enthält sowie Retikulumzellen, die runde Kerne mit einem feinen Chromatingerüst besitzen und deren Fortsätze miteinander kommunizieren (SAITOH et al. 1982). Erythrozyten treten in geringer Menge auf, während Granulozyten und Plasmazellen fehlen (SAITOH und KAMIYAMA 1978). Diese Zone kann nicht im Bereich jedes Follikels nachgewiesen werden. Dreidimensional stellt sie sich wie ein zur PALS hin offener Ball dar, d.h. sie umgibt nur den Follikel, findet jedoch keine Fortsetzung im Bereich der PALS (TAKASAKI 1979).

Peripher schließt sich nun eine Zone longitudinal ausgerichteter und verdichteter fibroblastischer Retikulumzellen an (Fig. 2; GZ), die Öffnungen enthält, durch die sich Lymphozyten hindurchschieben (SAITOH et al. 1982). Die Grenzzone und die helle Innenzone sind nur schwach vaskularisiert (SAITOH und KAMIYAMA 1978; TAKASAKI 1979).

Schließlich folgt eine dunkle Außenzone (Fig. 2; DAZ), deren Gerüst von fibroblastischen Retikulumzellen mit ovalen Kernen gebildet wird. Neben kleinen und mittelgroßen Lymphozyten finden sich hier auch zahlreiche Erythrozyten und Granulozyten sowie viele Kapillaren, sowohl Hülsekapillaren (Fig. 2; H) als auch freie Kapillaren ohne Hüllen, die sich bis an die Grenzzone zwischen der hellen Innen- und der dunklen Außenzone verfolgen lassen. Im Bereich der PALS fehlt die für das perifollikuläre Grenzgebiet charakteristische helle Innenzone. An der Oberfläche der PALS

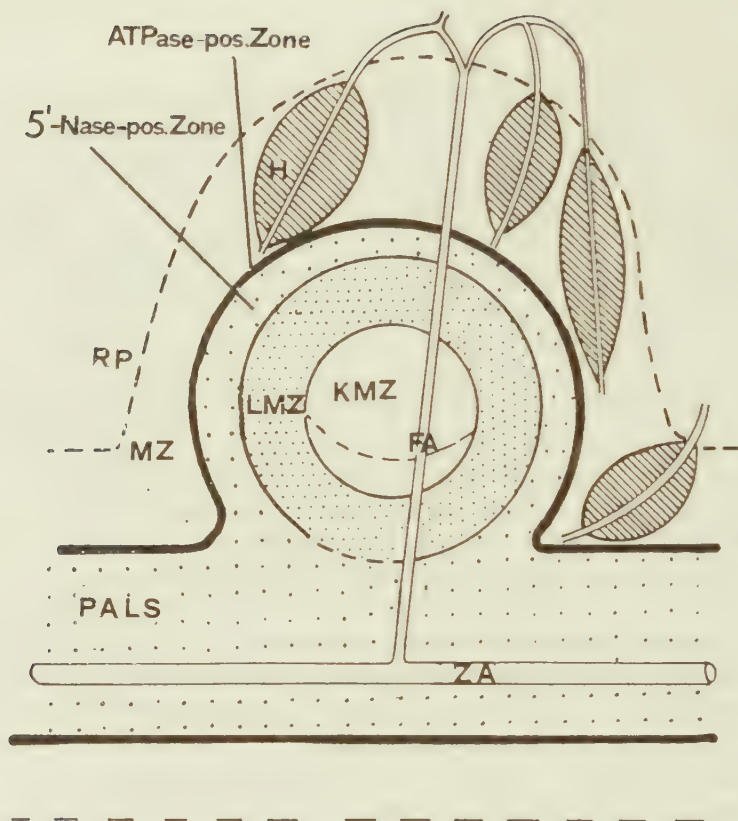


Fig. 1 Grenzgebiet zwischen weißer und roter Milzpulpa
des Schweines

KMZ: Keimzentrum; LMZ: Lymphozytenmantelzone;
5'-Nase-pos. Zone: 5'-Nukleotidase-positive Zone an der Follikelperipherie; PALS: periarterioläre lymphatische Scheide;
ATPase-pos. Zone: ATPase-positive Zone aus fibroblastischen Retikulumzellen und glatten Muskelzellen; MZ: Marginalzone;
H: Hülse; RP: rote Pulpa; ZA: Zentralarterie; FA: Follikelarterie.

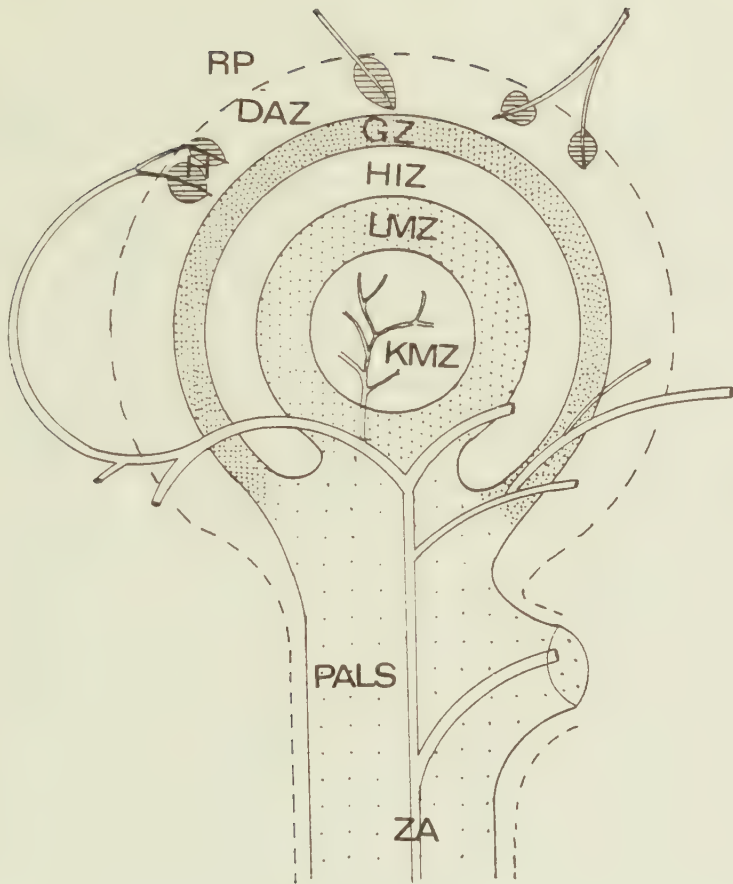


Fig. 2 Grenzgebiet zwischen weißer und roter Milzpulpa
des Menschen (nach TAKASAKI 1979)

KMZ: Keimzentrum; LMZ: Lymphozytenmantelzone;
HIZ: helle Innenzone; GZ: Grenzzone; PALS: periarterioläre
lymphatische Scheide; DAZ: dunkle Außenzone;
RP: rote Pulpa; H: Hülse; ZA: Zentralarterie.

liegen longitudinal angeordnete fibroblastische Retikulumzellen, die kontinuierlich in die Grenzzone zwischen der hellen Innen- und der dunklen Außenzone übergehen.

Zwischen diese oberflächliche Bedeckung der PALS und die rote Pulpa schiebt sich eine mit der dunklen Außenzone des perifollikulären Bereichs baugleiche Zone ein, die mit dieser auch in Zusammenhang steht (TAKASAKI 1979).

SAITOH und KAMIYAMA (1978) sowie SAITOH et al. (1982) fassen die drei referierten Zonen unter dem Oberbegriff "boundary zone" zusammen. Daraus läßt sich ableiten, daß diese Autoren die drei Zonen als Marginalzone ansehen, obwohl sie zu dieser Frage nicht ausdrücklich Stellung nehmen.

TAKASAKI (1979) dagegen sieht in der Grenzzone zwischen der dunklen Außenzone und der hellen Innenzone die Grenze zwischen Marginalzone und weißer Pulpa, woraus sich ergibt, daß der Autor die helle Innenzone der weißen Pulpa zuschlägt.

Für einen Vergleich der Verhältnisse bei Mensch und Schwein bietet es sich an, mit der dunklen Außenzone zu beginnen, da sich ihr in der Milz des Schweines eine offensichtlich übereinstimmend gebaute Zone zuordnen läßt. Danach entspricht der dunklen Außenzone des Menschen beim Schwein der am weitesten peripher liegende Bereich des Grenzgebietes zwischen roter und weißer Pulpa (Fig. 1; MZ). Bei beiden Spezies liegen hier zahlreiche Hülsenkapillaren, freie Zellen des Blutes sowie lymphatische Zellen im Maschenwerk des retikulären Grundgerüsts. In beiden Milzen umgibt diese Zone sowohl die PALS als auch die Follikel. Ihre Grenze zur roten Pulpa ist fließend, zentralwärts dagegen deutlich abgesetzt.

Auch für die beim Menschen verdichtete Zone zwischen dunkler Außenzone und heller Innenzone findet sich beim Schwein eine korrespondierende Bildung (Fig. 1, DZ): Hier liegt eine schmale Zone aus verdichteten fibroblastischen Retikulumzellen, extrazellulärem Material und vereinzelt glatten Muskelzellen. Diese Zone läßt sich mit Hilfe eines ATPase-Nachweises als distinktes Band darstellen, welches

sowohl die PALS als auch die Follikel umgibt (BADER 1981). Für eine Entsprechung von ATPase-positiver Zone des Schweines und Grenzzone des Menschen spricht, daß sich in beiden Milzen die terminalen arteriellen Kapillaren, nachdem sie aus den Hülzen ausgetreten sind, bis an diese Zone verfolgen lassen.

Die charakteristische Vaskularisation und das Auftreten von freien Blutzellen im extrazellulären Raum sprechen für die Annahme, daß es sich bei dem Gebiet zwischen roter Pulpa und ATPase-positiver Grenzzone um die eigentliche Marginalzone der Schweinemilz handelt.

Für die sich zentralwärts im follikulären Bereich anschließende helle Innenzone läßt sich in der Schweinemilz keine baugleiche Zone nachweisen.

Die folgenden Argumente sprechen gegen eine Übereinstimmung der hellen Innenzone des Menschen mit der 5'-Nase-positiven Zone des Schweines, die sich zentral an die ATPase-positive Zone anschließt:

1. Die helle Innenzone des Menschen ist auf das perifollikuläre Gebiet beschränkt und fehlt um die PALS. Die 5'-Nase-positive Zone des Schweines findet dagegen Anschluß an die PALS.
2. Beim Menschen fehlen in der hellen Innenzone Granulozyten und Plasmazellen, Erythrozyten kommen dagegen in geringen Mengen vor (SAITOH und KAMIYAMA 1978). In der 5'-Nase-positiven Zone des Schweines fehlen dagegen Erythrozyten und Granulozyten, während Plasmazellen vorhanden sind.
3. Das retikuläre Grundgerüst in der hellen Innenzone des Menschen enthält rundkernige Retikulumzellen mit lockerer Chromatinstruktur, die keine bevorzugte Ausrichtung ihrer Zellfortsätze zeigen (SAITOH et al. 1962). Beim Schwein ist das Grundgerüst der 5'-Nase-positiven Zone dagegen aus spindelförmigen nichtlymphatischen Zellen mit chromatindichteren Kernen und tangential zur Follikeloberfläche ausgerichteten Zellfortsätzen aufgebaut.

Diesen Bauunterschieden stehen nur wenige Übereinstimmungen der hellen Innenzone des Menschen und der 5'-Nase-positiven Zone des Schweines gegenüber, etwa die bei beiden Spezies stark schwankende Breite dieser Zonen oder die bevorzugte Besiedlung der Zonen mit Lymphozyten sowie die schwache Vaskularisation.

Aus der oben für die Marginalzone erörterten Argumentation ergibt sich zunächst, daß die 5'-Nase-positive Zone des Schweines einen Bestandteil der weißen Pulpa und nicht der Marginalzone darstellt. Entwicklungsgeschichtliche, vergleichend-zytologische und histochemische Überlegungen legen die Vorstellung nahe, daß diese Zone als Fortsetzung der PALS auf die Follikeloberfläche und nicht als Teil des Follikels selbst angesehen werden muß.

In der Embryogenese werden zunächst die PALS angelegt, in denen sich peripher die Sekundärfollikel nach der Geburt hineinentwickeln (JÄGER 1929; VEERMAN und VAN EWIOK 1975). Dabei wölben die sich ausbildenden Follikel die PALS an ihrer Oberfläche vor.

Die Übereinstimmende Feinstruktur und 5'-Nase-Aktivität der nichtlymphatischen gerüstbildenden Zellen in PALS und 5'-Nase-positiver Zone wird später eingehender diskutiert. Über ähnliche Verhältnisse in der Milz der Ratte haben CATAYEE und Mitarbeiter (1974) berichtet. Auch bei dieser Spezies treten 5'-Nase-positive, nichtlymphatische Zellen in der PALS und an der Oberfläche der Follikel auf. Die Autoren vermuten, daß in der perifollikulären Zone T-Lymphozyten zwischen den nichtlymphatischen Zellen angesiedelt sind. Es ist jedoch zweifelhaft, ob diese Befunde mit denen in der Schweinemilz verglichen werden dürfen, da die 5'-Nase-Reaktion von den Autoren bei pH 6,2 durchgeführt wurde. Bei diesem pH ist eine Mitreaktion der sauren Phosphatasen nicht auszuschließen.

Ferner lassen auch zytologische Fakten einen Vergleich der

5'-Nase-positiven perifollikulären Zonen bei Ratte und Schwein fragwürdig erscheinen. Bei der Ratte liegen in diesem Gebiet die marginalen metallophilen Zellen (SNOOK 1964; STREEFKERK und VEERMAN 1971), für die bisher bei anderen Spezies keine entsprechenden Zellelemente nachgewiesen werden konnten. Ebenso fehlt beim Schwein die Basalmembran, die diese Zone bei der Ratte peripher gegen die Marginalzone begrenzt (SASOU et al. 1976).

Eine kürzlich von BLUE und WEISS (1981 a) veröffentlichte Untersuchung über die Feinstruktur der Marginalzone in der Katzenmilz hat keine Anhaltspunkte für eine morphologische oder funktionelle Untergliederung des Gebietes zwischen weißer und roter Pulpa ergeben. Hier, wie auch bei anderen Spezies, liegen offenbar einfachere Verhältnisse in diesem Bereich vor als bei Mensch, Schwein und Ratte.

Hilfreich für die Zuordnung der 5'-Nase-positiven Zone des Schweines wäre auch eine immunhistochemische Analyse der in diesem Gebiet angesiedelten Lymphozyten. STEIN et al. (1980) konnten in ihrer Untersuchung des lymphatischen Gewebes des Menschen zeigen, daß B-Lymphozyten in der Mantelzone von Sekundärfollikeln IgM und IgD an ihrer Oberfläche tragen. Für die Milz des Schweines konnte mit dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis nach GUTMAN und WEISSMAN (1972) gezeigt werden, daß auch hier die Lymphozytenmäntel der Sekundärfollikel mit Lymphozyten besiedelt sind, die IgM an ihrem Plasmalemm tragen. Die peripher davon liegende 5'-Nase-positive Zone enthält neben solchen, fluoreszenzmikroskopisch positiv dargestellten Zellen auch Zellen, deren Plasmalemm nicht fluoresziert. Es liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei ihnen um T-Lymphozyten handelt.

Eine Untersuchung an Darm und Tonsillen des Menschen (JANOSI et al. 1980) hat ergeben, daß T-Zellsubpopulationen unterschiedliche Mikroumgebungen aufsuchen. Während T-Helfer-Zellen zu Zellen, die Ia-Antigene exprimieren, wie ID2 und Ia⁺-Makrophagen, in enger mikroanatomischer Beziehung stehen, liegen T-Suppressor-Zellen räumlich von diesen ge-

trennt. In der 5'-Nase-positiven Zone des Schweines konnten bei der elektronenmikroskopisch-histologischen Untersuchung keine IDZ und nur sehr selten Makrophagen festgestellt werden. Dies könnte für eine Besiedlung der 5'-Nase-positiven Zone mit T-Suppressor-Zellen sprechen. Zur Klärung dieser Frage müßte eine Untersuchung der hier angesiedelten Lymphozyten mit einem anti-T-Zellserum sowie mit monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene von T-Zellsubpopulationen des Schweines durchgeführt werden.

Anschließend an die topographische Zuordnung der enzymaktiven Zonen in der weißen Milzpulpa des Schweines soll nun auf die mit den Enzymaktivitäten assoziierten Zellen und Strukturen näher eingegangen werden.

Die in der PALS und im Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone beschriebenen 5'-Nase-positiven Zellen sind im vorangegangenen Teil der Diskussion als gerüstbildende nichtlymphatische Zellen angesprochen worden. Diese Charakterisierung läßt sich über die morphologischen Befunde und die bekannte Embryogenese der weißen Milzpulpa begründen:

Die in der PALS und im follikulären Grenzgebiet beschriebenen Zellen besitzen neben dem gleichen Ektoenzym auch gemeinsame morphologische Eigenschaften. Sie sind durch lange Zellfortsätze, die mittels Kontakteinrichtungen untereinander in Verbindung stehen, ausgezeichnet und umhüllen mit ihren Zellfortsätzen Stränge von amorphem und fibrillärem extrazellulärem Material.

Aus zwei elektronenmikroskopischen Studien zur Entwicklung der menschlichen Milz (WEISS 1973; WEISS und CHEN 1974) geht hervor, daß die Milzanlage 38 mm Scheitel-Steiß-Länge messender Embryonen aus einem dreidimensionalen Netzwerk verzweigter Zellen besteht. Diese Zellen werden von WEISS (1973) als retikuläre Zellen, das Netzwerk als primäres Retikulum bezeichnet. Bei Embryonen von 50 mm SS-Länge

tritt in Verbindung mit dem zellulären primären Retikulum extrazelluläres Material auf, in dem der Autor Retikulinfasern sieht. Zunächst umhüllen die Zellen des primären Retikulums das extrazelluläre Material noch nicht. Erst bei Embryonen von 98 mm SS-Länge zeigt sich eine enge Assoziation zwischen Zellen und extrazellulären Fasern. Parallel dazu wird das Zytoplasma elektronenoptisch dicht; es entstehen die sogenannten "dunklen" retikulären Zellen. Durch konzentrische Anordnung dieses Netzwerks aus retikulären Zellen und Retikulinfasern um einzelne Gefäßäste entstehen die PALS, in die erst dann zunächst mittelgroße und anschließend kleine Lymphozyten einwandern (WEISS und CHEN 1974).

Da in der vorliegenden Arbeit die untersuchten 5'-Nase-positiven Zellen zahlreiche Parallelen in ihrem histologischen Verhalten zu den retikulären Zellen von WEISS (1973) erkennen lassen, sind sie hier als gerüstbildende nichtlymphatische Zellen eingeordnet worden. Der von WEISS (1973) verwendete Terminus "retikuläre Zelle", der als synonym mit "Retikulumzelle" angesehen werden kann, ist wegen seiner Mehrdeutigkeit in der neueren Literatur kritisiert worden (VAN FURTH 1980), und es wurde vorgeschlagen, diese Bezeichnung ganz fallenzulassen. Da der Begriff aber fest eingebürgert ist, wurden in dieser Arbeit die nichtlymphatischen Zellen nach dem Vorschlag von MÜLLER-HERMELINK und LENNERT (1978) mit entsprechenden Zusätzen als histiozytäre, interdigitierende, dendritische oder fibroblastische Retikulumzellen bezeichnet. Folgt man dieser Einteilung, so müssen die 5'-Nase-positiven Zellen der PALS und des follikulären Grenzgebietes als fibroblastische Retikulumzellen (FRZ) bezeichnet werden.

Die Zellen fallen lichtoptisch durch ihre gute Färbbarkeit mit Methylenblau in den Semidünnschnitten auf. In Übereinstimmung mit den retikulären Zellen von WEISS und CHEN (1974) besitzt ihr Zytoplasma auch hohe Elektronendichte. Diese Eigenschaft zeichnet die Zellen der Follikelperiphe-

rie des Schweines in stärkerem Maße aus als jene der PALS und erklärt sich aus der Einlagerung von Bündeln intrazytoplasmatischer Mikrofilamente, die von noch stärker elektronendichten Knoten unterbrochen werden. Die Filamentbündel liegen direkt unterhalb des Plasmalemm und füllen im Bereich der Fortsätze das Grundplasma nahezu aus. Sie bestehen beim Schwein aus zwei Arten von Mikrofilamenten, dünnen Filamenten mit einem Durchmesser von 4-5 nm, die einen dichten Filz bilden, sowie einzelnen Filamenten mit einem Durchmesser von 8-9 nm.

Mehrere Autoren haben übereinstimmend gebaute Zellen in verschiedenen Milzprovinzen unterschiedlicher Spezies beschrieben. Bereits 1964 hat WEISS in der Marginalzone der Kaninchenmilz auf FRZ mit einer verdichteten subplasmalemalen Zone aufmerksam gemacht, ohne jedoch in ihr Mikrofilamente zu identifizieren. SAITO (1977) wies in allen Bereichen der weißen und roten Pulpa und in der Marginalzone der Rattenmilz FRZ mit intrazytoplasmatischen Filamentbündeln nach, deren Filamente einen Durchmesser von 4-5 nm besaßen. Elektronendichte Knoten wurden hier ebenfalls beobachtet.

Besonders reich an intrazytoplasmatischen Filamentbündeln waren auch die FRZ in der roten Pulpa der Hundemilz (BLUE und WEISS 1981 b). Damit stellt sich die Frage nach Natur und Funktion dieser Mikrofilamente.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen gestatten an Hand des Durchmessers nur eine vorläufige Zuordnung. Danach muß bei den 4-5 nm dicken Filamenten an Aktinfilamente gedacht werden. Die 8-9 nm dicken Filamente könnten zu den Intermediärfilamenten gehören. Die Intermediärfilamente werden heute im Sinne eines Zytoskeletts gedeutet; hinsichtlich der dünnen Filamente werden sowohl Stützfunktionen als auch die Beteiligung an kontraktilen Systemen diskutiert. Für die letztere Vorstellung sprechen auffällige Parallelen in der Feinstruktur von FRZ und glatten Muskelzellen. Durch immunhistochemische und in vitro-Untersuchungen

verschiedener Autoren ist diese Annahme gestützt worden. So konnte die Arbeitsgruppe um MÜLLER-HERMELINK (1981) in den FRZ der menschlichen Milz Aktin und Myosin immunhistochemisch nachweisen. Feinstrukturell sind diese Zellen wie die FRZ anderer Spezies aufgebaut. Für die Funktion dieser Zellen diskutieren die Autoren eine Regulation des Tonus im dreidimensionalen Netz der Retikulinfasern, wodurch die Wanderung der freien Zellen beeinflusst werden könnte. SAITO (1977) vermutet dagegen eher eine Regulation der Durchblutung in der weißen Milzpulpa über die kontraktile FRZ. BLUE und WEISS (1981 b) deuten die von ihnen in der roten Milzpulpa des Hundes beschriebenen FRZ ebenfalls im Sinne der Kontraktilität, wofür als Argument auch die von diesen Autoren beobachtete Innervation angeführt werden kann.

Indizien für die Kontraktilität von Fibroblasten haben sich auch aus der Untersuchung anderer Gewebe ergeben. MAJNO et al. (1971), MAJNO (1977), GABBIANI und MONTESANO (1977) sowie GABBIANI et al. (1978) haben die Kontraktion von Granulationsgeweben über diesen Mechanismus erklärt. Ebenso wird der Tonus des elastischen Apparates der Lunge offenbar durch kontraktile Fibroblasten gesteuert (KAPANCI et al. 1974). Diese Zellen werden von den Autoren als Myofibroblasten bezeichnet.

BELLOWS und Mitarbeiter (1982) haben die Kontraktilität von Fibroblasten aus dem Periodontium in vitro beweisen können. Diese Zellen treten in zwei feinstrukturell abweichenden Zustandsformen auf, mit synthetisierendem oder kontraktilen Phänotyp. Die kontraktile Form wird wieder als Myofibroblast bezeichnet.

Nachdem Untersuchungen zum Nachweis von Aktin und Myosin an der Milz des Schweines bisher ausstehen, bleibt man für die funktionelle Deutung der FRZ bei dieser Spezies zunächst auf Analogieschlüsse angewiesen.

Zu dem zuvor diskutierten Netz 5'-Nase-positiver FRZ in der

PALS und im Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone steht ein Netz aus amorphem und fibrillärem Material in enger Beziehung, was die Frage nach Herkunft und Zusammensetzung dieses Netzes aufwirft. Es läßt sich in übereinstimmender Weise mit drei unterschiedlichen Techniken darstellen. Die Imprägnierbarkeit dieses Netzes mit der Technik nach NOVOTNY-GOMMERT legt die Annahme nahe, daß es sich hier um Retikulinfasern handelt. Dafür spricht ebenfalls, daß das Netz PAS-positiv reagiert. Die Färbbarkeit des Netzes mit der Bindegewebsfärbung nach PASINI kann als Hinweis auf das Vorkommen kollagener Mikrofibrillen gedeutet werden. Ein nach Lage und Aussehen übereinstimmendes Netz extrazellulären Materials haben PABST und BINNS (1952) kürzlich durch Fluochromierung überlebender Milzen des Schweines mit Fluoreszeinisothiocyanat dargestellt.

Die elektronenoptischen Befunde bestätigen, daß in diesem Netz dünne Mikrofibrillen mit einer periodischen Querstreifung auftreten, die als kollagene Mikrofibrillen gedeutet werden müssen. In dem amorphen Material können Glykoproteine und Proteoglykane vermutet werden, die für die positive PAS-Reaktion verantwortlich sind. Neben diesen für Retikulinfasern typischen Strukturelementen treten aber auch fibrilläre Strukturen mit auffällig geringer Elektronendichte auf, die peripher von feinsten Mikrofilamenten ohne Querstreifung mantelartig umgeben werden, wie es für elastisches Material charakteristisch ist. MIYATA und TAKAYA (1961) konnten das Vorkommen elastischer Fasern in Verbindung mit FRZ des Lymphknotens der Ratte dadurch nachweisen, daß sie die elektronenoptisch gut mit Orcein färbbaren elastischen Fasern einer Verdauung durch Elastase unterwarfen.

Schließlich treten im extrazellulären Material, das mit den 5'-Nase-positiven Zellen assoziiert ist, feine Mikrofilamente ohne erkennbare Querstreifung auf, deren Natur nicht gedeutet werden kann.

Einen gleichartigen Bau des extrazellulären Materials haben GALINDO und IMAEDA (1962) in den Milzen verschiedener Spezies und WEISS (1964) in der Milz des Kaninchens gefunden, wo-

raus geschlossen werden kann, daß das extrazelluläre Material hier immer aus den gleichen Komponenten zusammengesetzt ist.

Für die enge Beziehung zwischen 5'-Nase-positiven FRZ und dem extrazellulären Material spricht die Beobachtung hemidesmosomaler Kontakteinrichtungen, über die Bewegungen des Zellnetzes auf das Fasernetz übertragen werden könnten. Hemidesmosomen wurden bereits von SAITO (1977) an FRZ in der Milz der Ratte beschrieben und von MÜLLER-HERMELINK et al. (1981) für die Milz des Menschen bestätigt. Beide Autoren haben zwischen den FRZ der untersuchten Spezies auch Kontakteinrichtungen beobachtet, die von ihnen als Desmosomen gedeutet wurden. Von GROßCURTH (1980 a) wurde am Beispiel des Lymphknotens der Maus darauf hingewiesen, daß sich diese Desmosomen durch das Fehlen eines elektronendichten Bandes im Interzellularspalt von denen epithelialer Zellen unterscheiden. Beim Schwein ist der Interzellularspalt mit elektronendichtem Material ausgefüllt, das aber ebenfalls nicht bandartig kondensiert ist.

Neben mechanischen Kontakteinrichtungen gibt es auch Hinweise auf eine elektrotonische Verknüpfung von FRZ, nachdem SAITO (1977) und MÜLLER-HERMELINK et al. (1981) "gap junction"-ähnliche Strukturen gefunden haben, über die sich die Erregung in dem Zellnetz ausbreiten könnte. Ähnliche Kontakte wurden beim Schwein jedoch nicht beobachtet.

Die enge Verbindung der 5'-Nase-positiven Zellen mit dem extrazellulären Material legt die Vermutung nahe, daß die Zellen auch für eine Synthese dieses Materials verantwortlich sein könnten, eine Annahme, die auch durch die Bezeichnung "fibroblastische" Retikulumzelle suggeriert wird. Hierfür liegen bisher bei keiner Spezies direkte Beweise vor. Die gute Differenzierung des rauen endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates lassen sich aber als indirekte Argumente für eine Proteinsynthese dieser Zellen deuten. In diesem Sinne haben sich auch MERKER und STRUWE

(1971) geäußert.

Die alkalische Phosphatase-positiven Zellen des Lymphozytenmantels der Sekundärfollikel wurden, wie die 5'-Nase-positiven Zellen der PALS und des Grenzgebietes zwischen Follikel und Marginalzone, als nichtlymphatische Zellen angesprochen. Sie besitzen ebenfalls lange Zellfortsätze, Kontakteinrichtungen sowie eine enge Beziehung zu extrazellulärem Material.

Für den nichtlymphatischen Charakter der alkalische Phosphatase-positiven Zellen des Lymphozytenmantels haben sich auch aus der Follikelentwicklung während der Embryogenese Anhaltspunkte finden lassen.

Eine kürzlich durchgeführte Untersuchung der Gaumenmandel des Menschen (VON GAUDECKER und MÜLLER-HERMELINK 1982) hat ergeben, daß in diesem Organ Primärfollikel angelegt werden, noch bevor deren Bildung in anderen lymphatischen Organen einsetzt. Im frühen Tonsillenprimordium, bei Embryonen mit 13,5 cm Scheitel-Steiß-Länge, werden zwei Typen mesenchymaler Zellen angetroffen. Dies sind zum einen helle mesenchymale Zellen, die auf Grund ihrer Anordnung, zirkulär oder längs orientiert, als Vorläufer von Endothelzellen angesehen werden. Der andere Typ mesenchymaler Zellen, der als Vorläufer der FRZ gedeutet wird, besitzt ein dunkles Zytoplasma, welches zahlreiche Mikrofilamente enthält. Seine Zellfortsätze sind durch desmosomale Kontakte mit denen benachbarter, gleichartiger Zellen verbunden. In enger Nachbarschaft liegen kollagene Mikrofibrillen. Bei Embryonen von 15-16 cm SS-Länge haben sich knötchenartige Ansammlungen von Lymphozyten gebildet; zwischen den Lymphozyten liegen nach diesen Autoren helle nichtlymphatische Zellen mit kurzen Zytoplasmaausläufern, die untereinander durch kleine Desmosomen verknüpft sind. Diese Zellen wandeln sich in nichtlymphatische DRZ um, die sich durch lange Fortsätze und desmosomale Kontakte auszeichnen. In dieser Form sind

sie bei Embryonen mit 24 cm SS-Länge deutlich nachweisbar. FRZ werden von den Autoren ebenfalls in den frühen Primärfollikeln beschrieben. Sie sind hier jedoch nicht so zahlreich vertreten wie im interfollikulären Gebiet.

Am Beispiel des Cortex von Mesenteriallymphknoten der Maus beschrieb GROßCURTH (1980 b) die Ausdifferenzierung von definitiver nichtlymphatischen Zellen aus Vorläufern, die von ihm als primitive Retikulumzellen bezeichnet werden. Noch zum Zeitpunkt der Geburt werden hier ausschließlich diese primitiven Retikulumzellen gefunden, die dadurch charakterisiert sind, daß sie untereinander desmosomale Kontakte ausbilden und mit kleinen Bündeln retikulärer Fasern vergesellschaftet sind. Ihr Zytoplasma enthält große Mengen von Mono- und Polyribosomen. Bereits sieben Tage nach der Geburt hat sich die Menge der primitiven Retikulumzellen in der Lymphknotenrinde verringert, und es haben sich FRZ und DRZ ausdifferenziert. Darüberhinaus konnte GROßCURTH (1980 b) auch Übergangsformen zwischen FRZ und DRZ zu diesem Zeitpunkt nachweisen. Da die primitive Retikulumzelle verschiedene, sowohl für FRZ als auch für DRZ charakteristische Merkmale aufweist und Übergangsformen zwischen beiden Zelltypen gefunden werden, vermutet der Autor, daß beide Zellen miteinander verwandt sind und daß sie sich während der Ontogenese des Lymphknotens aus der primitiven Retikulumzelle differenzieren.

Auch in den lymphatischen Organen adulter Tiere sind solche Übergangsformen zwischen FRZ und DRZ von verschiedenen Autoren in den Keimzentren der Sekundärfollikel beobachtet worden.

KAMPERDIJK et al. (1978) haben die primäre Immunantwort nach Gabe von Paratyphusvakzine im Lymphknoten der Ratte untersucht. In den vor der Immunisierung vorhandenen Primärfollikeln konnten hier keine typischen DRZ nachgewiesen werden. Zu Beginn der Keimzentrumsreaktion finden sich Lymphoblasten, Keimzentrums makrophagen sowie einzelne typische DRZ. Nach 8 Tagen sind zwischen den Lymphoblasten des

neugebildeten Keimzentrums FRZ nachweisbar, nach einem Zeitraum von 3 Wochen charakteristische DRZ sowie Übergangsformen zwischen DRZ und FRZ. Weitere 3 Wochen später finden sich hauptsächlich gut entwickelte DRZ im Keimzentrum.

HEUSERMANN et al. (1960) konnten bei der Entwicklung der Keimzentren in den Follikeln der Kaninchenmilz Übergangsformen zwischen FRZ und DRZ nachweisen. Beim Kaninchen bilden FRZ das Grundgerüst der gesamten weißen Milzpulpa. Im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Menschen, wo diese Zellen auf die T-Zellgebiete der weißen Pulpa beschränkt sind, sind dunkle FRZ bei dieser Spezies auch innerhalb der Primärfollikel vorhanden, während DRZ fehlen. Durch Verabreichung von Schaferythrozyten induzierten die Autoren experimentell die Bildung von Keimzentren in den Primärfollikeln. Während zunächst in den neugebildeten Keimzentren und in den Lymphozytenmänteln noch typische FRZ auftraten, wurden vom 13. bis 18. Tag nach Antigenstimulation Übergangsformen zwischen FRZ und DRZ gesehen, und typische DRZ waren erst ab dem 21. Tag anzutreffen. HEUSERMANN et al. (1960) schlossen daraus, daß sich DRZ durch direkte Umwandlung aus den FRZ entwickeln können.

MÜLLER-HERMELINK et al. (1981) haben in den Follikeln der Milz der Ratte und an menschlichen Tonsillen die Herkunft der DRZ und ihre Beziehung zu den FRZ untersucht. Auf Grund elektronenmikroskopischer Beobachtungen in den Tonsillen des Menschen und zellkinetischer Untersuchungen an den Milzen der Rattenembryonen kamen die Autoren zu dem Ergebnis, daß FRZ und DRZ zwar über einen gemeinsamen Vorläufer - die lokale primitive Mesenchymzelle-miteinander in Beziehung stehen, sich aber keine Anhaltspunkte für eine direkte Umwandlung finden lassen.

Aus diesen Befunden kann man bereits entnehmen, daß unterschiedliche nichtlymphatische Zellen in den Follikeln beheimatet sein können. Während NOSSAL et al. (1966) in den Primärfollikeln der Maus DRZ nachweisen konnten, die sie auf Grund ihrer Fähigkeit zur Bindung von Immunkomplexen

identifizierten, zeigten HEUSERMANN et al. (1980), daß beim Kaninchen hier nur FRZ vorkommen.

Übereinstimmend für alle Spezies geht aus der Literatur hervor, daß in den Keimzentren der Sekundärfollikel DRZ lokalisiert sind. BADER (1981) konnte in der Milz des Schweines nachweisen, daß die Fortsätze der DRZ bis in den Bereich des Lymphozytenmantels hineinreichen. Auch bei der Maus sind im Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel DRZ gefunden worden (CHEN et al. 1978). Nichtlymphatische Zellen, die sowohl Charakteristika von DRZ als auch von FRZ aufweisen, wurden in den Keimzentren von Sekundärfollikeln bei Ratte und Kaninchen (KAMPERDIJK et al. 1978; HEUSERMANN et al. 1980) sowie in der Lymphknotenrinde der Maus (GROßCURTH 1980) angetroffen.

Die feinstrukturelle Untersuchung der nichtlymphatischen alkalische Phosphatase-positiven Zellen des Lymphozytenmantels der Sekundärfollikel in der Milz des Schweines hat ergeben, daß auch diese Zellen Merkmale von FRZ und DRZ aufweisen. Eine Deutung dieses Befundes im Sinne der von HEUSERMANN et al. (1980) und MÜLLER-HERMELINK et al. (1981) aufgestellten Theorien über die Herkunft dieser Zellen ist jedoch allein an Hand der morphologischen Befunde nicht möglich. Da sich die von KAMPERDIJK et al. (1978) und von HEUSERMANN et al. (1980) gesehenen Übergangsformen nach Antigenstimulation in den Keimzentren der Sekundärfollikel nachweisen ließen, während sich die alkalische Phosphatase-positiven Zellen des Schweines im Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel befinden, ist es auch denkbar, daß man die Befunde aus der Literatur nicht ohne weiteres zu den Verhältnissen beim Schwein in Beziehung setzen darf, sondern daß es sich hier um eine von den Übergangsformen des Keimzentrums differente Zelle handelt. Daher sollen im folgenden die Gemeinsamkeiten der nichtlymphatischen Zellen des Lymphozytenmantels beim Schwein mit den FRZ und DRZ verglichen und anschließend mögliche Funktionen dieser Zellen diskutiert werden.

Wie es für die FRZ charakteristisch ist, sind das rauhe ER und der Golgi-Apparat der nichtlymphatischen Zellen des Lymphozytenmantels gut entwickelt. Auch sind immer einzelne elektronendichte Einschlüsse nachweisbar, die als Lysosomen gedeutet werden. Während die für die FRZ typischen dünnen Filamente fehlen, sind die 8-9 nm dicken Filamente, die als Intermediärfilamente angesprochen werden müssen, anzutreffen. Sie stehen in Beziehung zu elektronenoptisch verdichteten Bezirken, die an die elektronendichten Knoten der FRZ erinnern. Diese sind hier in geringerer Anzahl vorhanden und sind auch nicht so stark kondensiert, wie es in den FRZ der Fall ist.

Während lichtoptisch nur wenig extrazelluläres Material in den Lymphozytenmänteln der Sekundärfollikel nachgewiesen werden kann, finden sich bei der elektronenoptischen Untersuchung häufig feine Stränge fibrillären und amorphen extrazellulären Materials, die von den alkalische Phosphatase-positiven Zellen und ihren Fortsätzen eingehüllt werden. Es können alle Komponenten des extrazellulären Materials, die im Zusammenhang mit den 5'-Nase-positiven Zellen diskutiert wurden, auch in der Nachbarschaft der alkalische Phosphatase-positiven Zellen wiedergefunden werden. Dabei treten mengenmäßig die elastischen Fasern jedoch stark zurück.

Zum extrazellulären Material bilden die nichtlymphatischen Zellen des Lymphozytenmantels Kontakte aus, die an Hemidesmosomen erinnern. Das extrazelluläre Material liegt jedoch nicht, wie es für FRZ charakteristisch ist, dem Plasmalemm in weiten Bereichen an, sondern meist nur in kurzen Abschnitten im Bereich des Perikaryons oder größerer Zellfortsätze. Dadurch können die Zellen häufig mit gleichartigen benachbarten Zellen in Kontakt treten, wobei in solchen Bereichen desmosomale Kontakte ausgebildet sind. Diese gleichen formal den Kontakteinrichtungen der 5'-Nase-positiven Zellen.

Die nichtlymphatischen Zellen des Lymphozytenmantels unter-

scheiden sich von den DRZ des Keimzentrums durch die bei beiden Zelltypen unterschiedlichen Ektoenzyme. Während die DRZ durch ATPase-Aktivität gekennzeichnet sind (BADER 1981), tragen die nichtlymphatischen Zellen des Lymphozytenmantels alkalische Phosphatase-Aktivität an ihrem Plasmalemm. Hinsichtlich der Feinstruktur dieser Zellen haben sich eine Vielzahl von Übereinstimmungen mit den von BADER (1981) eingehend untersuchten DRZ des Keimzentrums ergeben.

Die Kerne beider Zellarten zeichnen sich durch ihre Größe, ihren geringen Gehalt an Heterochromatin sowie durch ihre übereinstimmende Form aus. Das Zytoplasma ist bei beiden Zellarten sehr elektronendurchlässig. Besonders ähnlich ist die Ausbildung der Zellfortsätze: Nach BADER (1981) besitzen die DRZ lange, weitverzweigte Fortsätze, die schließlich in büschelförmig angeordnete Mikrovilli übergehen. Diese Beschreibung paßt auch auf die Zellfortsätze der alkalische Phosphatase-positiven Zellen.

In der Literatur wird bei unterschiedlichen Spezies in erweiterten Interzellularspalten, die DRZ zugeordnet werden können, amorphes Material beschrieben (SZAKAL und HANNA 1968; ABE und ITO 1972). Auf dieses Material ist wahrscheinlich die positive PAS-Reaktion im Keimzentrum der Sekundärfollikel beim Schwein zurückzuführen. Dagegen sind im Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel keine PAS-positiven Strukturen darstellbar. Elektronenoptisch hat sich jedoch gezeigt, daß auch die nichtlymphatischen Zellen des Lymphozytenmantels mit amorphem Material, welches in erweiterten Interzellularspalten liegt, vergesellschaftet sind. Dieses kommt hier aber in geringerer Menge vor als im Keimzentrum. Schließlich sind die desmosomalen Kontakte, durch die die alkalische Phosphatase-positiven Zellen miteinander verknüpft werden, auch für DRZ charakteristisch (SWARTZENDRUBER 1965).

Der Vergleich der alkalische Phosphatase-positiven Zellen aus der Lymphozytenmantelzone des Schweines mit FRZ und DRZ

ergibt also, daß diese Zellen den DRZ morphologisch näher stehen als den FRZ.

In die sich nun anschließenden Überlegungen zur Herkunft und Funktion der alkalische Phosphatase-positiven Zellen des Schweines müssen deshalb auch mögliche Beziehungen zu den DRZ mit einbezogen werden. Daneben ist auch die Frage zu diskutieren, ob diesen Zellen eine gerüstbildende Funktion für die Lymphozytenmantelzone der Sekundärfollikel zukommt; ferner ihre Bedeutung für das Mikromilieu, in dem sich die Lymphozyten der Mantelzone aufhalten.

Im Gegensatz zu anderen Spezies, bei denen ein Grundgerüst aus FRZ und extrazellulärem Material auch in der Lymphozytenmantelzone nachzuweisen ist, wie etwa beim Kaninchen (HEUSERMANN et al. 1980), fehlt dieses hier dem Schwein. Die Vermutung, daß die alkalische Phosphatase-positiven Zellen des Schweines ein zelluläres Grundgerüst für die Mantelzone der Sekundärfollikel aufbauen, liegt deshalb nahe. Die sehr langen und verzweigten Fortsätze dieser Zellen deuten aber an, daß hier auch an andere Funktionen gedacht werden muß, für die eine Oberflächenvergrößerung erforderlich ist.

Bereits 1963 beschrieb WHITE in den Keimzentren des Hühnchens Zellen, die die Fähigkeit besaßen, Antigen-Antikörperkomplexe an ihrer Oberfläche zu binden, jedoch keine Endozytosefähigkeit zeigten. Diese, zunächst über ihre Funktion nachgewiesenen Zellen wurden später als dendritische Retikulumzellen (DRZ) charakterisiert. Ihnen wird Bedeutung für die Präsentation von Immunkomplexen zugeschrieben (NOSSAL et al. 1968; EICKELENBOOM 1978; MANDEL et al. 1980). Beim Schwein besitzen die DRZ der Keimzentren ebenfalls die Fähigkeit, Immunkomplexe zu binden (BADER 1981).

Auf die Frage, über welche Wege die Immunkomplexe in die Follikel gelangen, geben die Experimente von VAN ROOIJEN (1977) Auskunft. Er untersuchte die Bindung von Immunkom-

plexen in den Sekundärfollikeln der Mäusemilz. Den Tieren wurde humanes Serumalbumin, welches mit ^{125}J markiert war, injiziert. Wurden die Tiere eine halbe bis zwei Stunden nach der Injektion getötet, konnten die Antigen-Antikörperkomplexe in Marginalzone und Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel wiedergefunden werden. Zu Beginn dieses Zeitintervalls waren die Immunkomplexe vornehmlich in der Marginalzone lokalisiert, während nach zwei Stunden der Lymphozytenmantel bereits deutlich stärker markiert war. Tiere, die schon eine Woche zuvor eine Erstinjektion von markierten Antigen-Antikörperkomplexen erhalten hatten, zeigten zwei Stunden nach einer Zweitinjektion neben einer Markierung der Marginalzone und des Lymphozytenmantels auch innerhalb des Keimzentrums lokalisierte Immunkomplexe. Ferner konnte dieser Autor zeigen, daß nach zwei zeitlich aufeinander folgenden Behandlungen mit Immunkomplexen diese, nach Ablauf ihrer Wanderung in das Keimzentrum, hier schließlich an die selben Zellen gebunden waren (VAN ROOIJEN 1974).

Der Mechanismus, der für die Wanderung der Immunkomplexe von der Marginalzone durch den Lymphozytenmantel in das Keimzentrum verantwortlich ist, ist noch ungeklärt. Nachdem durch BROWN et al. (1973) bewiesen werden konnte, daß dieser Transportvorgang durch selektive Bestrahlung der Milz gehemmt werden kann, nicht jedoch durch Bestrahlung des ganzen Körpers, wurde die Vorstellung fallengelassen, daß Immunkomplexe an die Oberfläche rezirkulierender Lymphozyten gebunden in den Follikel einwandern. Es ist daher wahrscheinlich, daß entweder nichtrezirkulierende Lymphozyten oder stationäre nichtlymphatische Zellen für diesen Transport verantwortlich sind.

Wie KUMARARATNE et al. (1981) für die Rattenmilz nachweisen konnten, ist die Marginalzone, in der die Immunkomplexe zunächst lokalisiert sind, ein Gebiet, welches überwiegend von nichtrezirkulierenden B-Lymphozyten besiedelt ist. Für die Vorstellung, daß diese Lymphozyten nach Kontakt mit den Immunkomplexen in den Follikel einwandern, spricht auch, daß bei Mäusen, die einen Mangel an B-Lymphozyten aufweisen,

in Experimenten keine Bindung von markierten Immunkomplexen an DRZ gezeigt werden konnte (HUMPHREY 1961). Jedoch wäre es, um die von VAN ROOIJEN (1977) beobachtete starke Markierung des Lymphozytenmantels zu erreichen, notwendig, daß eine sehr große Anzahl von Lymphozyten in den Lymphozytenmantel übertritt. Demgegenüber konnten VEERMAN und VAN ROOIJEN (1975) eine Stunde nach Verabreichung der Immunkomplexe nur schwach markierte Lymphozyten in der Marginalzone sehen. Massive Einwanderung von Lymphozyten wurde nur nach Stimulation durch Endotoxine beobachtet (VEERMAN und DE VRIES 1976).

Diese Argumente sprechen nach VAN ROOIJEN (1977) für eine zumindest teilweise Wanderung der Immunkomplexe ohne Hilfe lymphatischer Zellen. Der Autor meint, daß dendritische Zellen für den intrafollikulären Transport von Antigen-Antikörperkomplexen verantwortlich sind und stellt drei Möglichkeiten des Transports zur Diskussion:

1. Mit Immunkomplexen beladene DRZ aus der äußeren Lymphozytenmantelzone wandern in das Keimzentrum der Follikel ein. Diese müßten dann sofort durch neue DRZ ersetzt werden, da es sich gezeigt hat, daß nach in zweistündigem Abstand aufeinanderfolgenden Gaben von Immunkomplexen die zuerst verabreichten Antigen-Antikörperkomplexe das Keimzentrum markieren, während die folgende Dosis im Lymphozytenmantel nachweisbar ist.
2. Der Follikel könnte in der Lage sein, sich auszudehnen, wodurch peripher gelegene DRZ eine mehr zentrale Position erreichen. Auch hier müßten die peripheren DRZ durch neue ersetzt werden.

Diese beiden Theorien erklären auch nicht, daß nach zeitlich aufeinander folgenden Gaben von Immunkomplexen diese schließlich an den selben Zellen des Keimzentrums lokalisiert sind (VAN ROOIJEN 1974).

3. Die Immunkomplexe könnten an den Fortsätzen nicht wandernder DRZ entlangtransportiert werden, die ein den ganzen Follikel durchsetzendes Maschenwerk bilden.

Zu dieser Vorstellung paßt auch die Beobachtung von VAN ROOIJEN (unveröffentlichte Beobachtung), daß die Immunkomplexe an linearen Strukturen innerhalb des Follikels lokalisiert sind.

Aus der Arbeit von VAN ROOIJEN (1977) muß der Schluß gezogen werden, daß in der Lymphozytenmantelzone der Maus nur kurzfristig immunkomplexbeladene DRZ auftreten, während die Zellen des Keimzentrums diese über einen Zeitraum von Wochen an ihrer Oberfläche fixieren.

BADER (1981) konnte beim Schwein Meerrettichperoxidase-antiMeerrettichperoxidase-Immunkomplexe vier Tage nach einer Zweitinjektion in den hellen Zonen der Keimzentren an der Oberfläche sternförmig verzweigter Zellen nachweisen; dagegen blieb der Lymphozytenmantel frei von Reaktionsprodukt. Dieses Untersuchungsergebnis steht nicht im Widerspruch zu den Befunden von VAN ROOIJEN (1977), denn die Beobachtung schließt nicht aus, daß die hellen nichtlymphatischen Zellen des Lymphozytenmantels beim Schwein die Fähigkeit besitzen, kurzzeitig Immunkomplexe an ihre Oberfläche zu binden. Hier stehen weitergehende Untersuchungen noch aus. Es könnte bereits mit einem Inkubationsversuch an Milzschnitten geklärt werden, ob die nichtlymphatischen Zellen im Lymphozytenmantel des Schweines in der Lage sind, Immunkomplexe zu binden, nachdem es sich gezeigt hat, daß die nichtlymphatischen Zellen in den Follikeln der Maus Immunkomplexe auch direkt aus dem Medium aufnehmen können (VAN ROOIJEN 1978).

Schließlich hat GROBCURTH (1980 a) vermutet, daß die DRZ über die Abgabe von Glykoproteinen ein Mikromilieu für die B-Lymphozyten aufbauen. Für diese Annahme spricht, daß KAISERLING (1977) im Zusammenhang mit B-Zellymphomen eine gleichzeitige Proliferation der DRZ beobachten konnte. Parallel dazu konnten im Interzellularraum in den Keimzentren Glykoproteine nachgewiesen werden (VELDMAN 1970; KAISERLING 1977). Lichtmikroskopisch kann auch im Keimzen-

trum der Sekundärfollikel des Schweines PAS-positives Material nachgewiesen werden, welches elektronenoptisch amorphes Material entspricht, welches in erweiterten Interzellularspalten liegt. Da solches Material auch in geringerer Menge im Bereich der nichtlymphatischen Zellen des Lymphozytenmantels vorhanden ist, läßt sich eine Einwirkung dieser Zellen auf B-Lymphozyten über Glykoproteine nicht ausschließen.

Ein weiterer Mechanismus der Interaktion zwischen nichtlymphatischen Zellen und Lymphozyten wurde von DE SOUSA (1969) diskutiert. Sie konnte am Beispiel des Lymphknotens der Maus zeigen, daß das retikuläre Grundgerüst in B- und T-Zellgebieten unterschiedlich angeordnet ist. Während in T-Zellgebieten eine lockere Anordnung nachweisbar ist, wird in B-Zellgebieten ein engmaschiges Netz gebildet. DE SOUSA vermutet, daß sich die rezirkulierenden Lymphozyten an diesen Strukturen orientieren. Die nichtlymphatischen Zellen des Lymphozytenmantels beim Schwein bilden, im Gegensatz zu den FRZ der 5'-Nase-positiven Gebiete, ebenfalls ein engmaschiges Netzwerk aus, welches demnach auch rezirkulierenden B-Lymphozyten als Leitstruktur dienen könnte.

Auf Grund der oben besprochenen Transportvorgänge von Immunkomplexen aus der Marginalzone in den Follikel sowie der angesprochenen topographischen Beziehungen der nichtlymphatischen Zellen zu den B-Lymphozyten des Lymphozytenmantels bietet sich für die alkalische Phosphatase-positiven Zellen folgende Funktionsvorstellung an:

Die Zellen bilden das stationäre dreidimensionale Grundgerüst des Lymphozytenmantels und dienen gleichzeitig der Weiterleitung von Immunkomplexen aus der Marginalzone, die an der äußeren Oberfläche ihres Plasmalemmas transportiert werden. Daneben könnten die alkalische Phosphatase-positiven Zellen auch die Rezirkulation der B-Lymphozyten der Mantelzone beeinflussen und an der Bildung der für sie erforder-

lichen Mikroumgebung beteiligt sein.

Für die Funktion der in den Milzen unterschiedlicher Spezies nachgewiesenen Enzymaktivitäten der alkalischen Phosphatase und 5'-Nase hat sich bisher keine zufriedenstellende Deutung finden lassen. Die Ursache hierfür liegt zunächst in einem grundsätzlichen Mangel an biochemischen Kenntnissen über die Aufgaben dieser beiden Enzyme im Stoffwechsel. Obwohl beide Ektoenzyme an sehr unterschiedlichen Zellen nachgewiesen worden sind, besteht für keinen Ort eine eindeutig bewiesene Funktionsvorstellung. Alle Überlegungen zu dieser Frage sind über Spekulationen oder vage Analogieschlüsse nicht hinausgekommen. Ferner bestehen große tierartliche Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation von alkalischer Phosphatase und 5'-Nase in den Milzen verschiedener Spezies. Aber auch innerhalb der Milz des Schweines ergeben sich Vergleichsschwierigkeiten, weil morphologisch ähnliche Zellen keine gleichartigen Enzymaktivitäten besitzen.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme entfalten ihre katalytische Aktivität an der Grenzfläche zwischen Plasmalemm und extrazellulärem Raum. Das bei der Hydrolyse freigesetzte Phosphat wird an der Oberfläche des äußeren Plasmalemmblattes gefällt. Es liegt deshalb die Annahme nahe, daß diese Enzyme in vivo Substrate aus dem extrazellulären Raum umsetzen. Über die natürlichen Substrate der alkalischen Phosphatase und 5'-Nase gibt es keine gesicherten Kenntnisse. Immerhin lassen sich Stoffgruppen angeben, die von diesen Enzymen bevorzugt umgesetzt werden. Für die 5'-Nase gehören hierzu alle Ribonukleosid-5'-phosphate und Nikotinamidmononukleotid. Ribose-5'-phosphat wird nur sehr langsam umgesetzt (HEPPEL 1961).

Alkalische Phosphatasen greifen die verschiedensten Phosphatester primärer und sekundärer aliphatischer Alkohole, Zuckeralkohole, zyklischer Alkohole, Phenole und Amine an

(STADTMAN 1961), daneben aber auch Nukleosidmono-, -di- und -triphosphate. Über die Konzentrationen dieser Substrate im extrazellulären Raum finden sich kaum Angaben in der Literatur. Für die Milz scheint ein Blick auf das Vorkommen solcher Verbindungen im Blut hilfreich, da zumindest für die Marginalzone die Zusammensetzung von Blut und extrazellulärem Milieu als gleich angesehen werden kann.

Für das Blutplasma des Menschen sind unter Ruhe- und Trainingsbedingungen die Konzentrationen von Adeninnukleotiden bestimmt worden. Es haben sich folgende Werte ergeben:

Adenosinmonophosphat	0,135	-	0,613	umol/l
Adenosindiphosphat	0,12	-	1,34	umol/l
Adenosintriphosphat	0,47	-	1,13	umol/l

(PARKINSON 1973).

Diese in der Blutflüssigkeit in messbaren, wenn auch äußerst geringen Konzentrationen vorkommenden Substrate können nun mit dem nach WEISS (1972) von der Marginalzone auf die weiße Pulpa gerichteten Flüssigkeitsstrom an die enzymaktiven Zellen herangetragen und an ihrem Plasmalemm dephosphoryliert werden. Im Sinne eines enzymatischen Filters ist die Wirkung der enzymaktiven Zonen im Follikelbereich bereits von BADER (1981) diskutiert worden. Danach wird durch Spaltung der Substrate, die mit der extrazellulären Flüssigkeit der Marginalzone herangetragen werden, in den inneren Bereichen des Follikels ein an Phosphorsäureestern armes Milieu aufgebaut.

Seit längerer Zeit ist die Existenz einer Barriere zwischen Marginalzone und Follikeln für korpuskuläre Elemente bekannt. Eisensaccharatoxid (SNOOK 1964), Thorotrast (WEISS 1964) oder Kohlepartikel (BURKE 1970) sind nicht in der Lage, von der Marginalzone in die Follikel überzutreten. Daher postuliert PEREIRA (1978) eine Schranke zwischen Blut und weißer Pulpa, für deren Existenz er auch in eigenen Untersuchungen Anhaltspunkte finden konnte. Er verabreichte Ratten mit dem Trinkwasser Silbernitrat über einen Zeitraum

von mehreren Monaten. Elektronenoptisch konnte er in den Marginalzonen der untersuchten Milzen eine starke Anreicherung von Silberpartikeln feststellen. In den periarteriolen Scheiden fand er dagegen nur feinverteilte Silberkörnchen, die sich extrazellulär zwischen die retikulären Fasern eingelagert hatten. Große und mittelgroße Partikel wurden an der bei der Ratte die weiße Pulpa umgebenden Basalmembran festgehalten. Auch aus den Kapillaren der weißen Pulpa wurden die Silberpartikel durch die zugehörigen Basallaminae am Übertritt gehindert. PEREIRA (1978) sieht daher als morphologisches Substrat dieser Barriere einerseits innerhalb der weißen Pulpa die Endothelien der Kapillaren an, die durch tight junctions verknüpft sind, andererseits an der Grenze zwischen Marginalzone und weißer Pulpa die hier ausgebildete Basallamina und die hier liegenden retikulären Zellen, die keine Makromoleküle aufnehmen oder transportieren. In topographisch vergleichbarer Position findet sich beim Schwein die verdichtete Zone ATPase-positiver FRZ an der Grenze zwischen Marginalzone und weißer Pulpa (BADER 1981).

Neben dieser gegen korpuskuläre Bestandteile gerichteten mechanischen Barriere wäre das Bestehen eines gegen bestimmte molekulare Bestandteile gerichteten enzymatischen Filters denkbar.

Nach MÜLLER-HERMELINK (1974) und MÜLLER-HERMELINK et al. (1976) benötigen die T- und B-Lymphozyten eine für sie spezifische Mikroumgebung, die das Rezirkulationsverhalten dieser Lymphozyten beeinflusst. Für die Bildung dieses Mikromilieus vermuten diese Autoren eine Mitbeteiligung der in der weißen Pulpa lokalisierten Ektoenzyme. Nach VEERHAN und VAN EWIJK (1975) ist im Bereich der Marginalzone der freie Kontakt der Lymphozyten mit dem strömenden Blut essentieller Bestandteil des Mikromilieus in diesem Gebiet. Eine Veränderung der die weiße Pulpa durchströmenden Flüssigkeit durch die aufeinanderfolgenden Zonen von

Phosphatasen im Follikelbereich ändert damit auch das Mikromilieu der hier lokalisierten lymphatischen Zellen. Jedoch ist bereits von BADER (1981) darauf hingewiesen worden, daß der Wahrscheinlichkeit dieser Vorstellung die starken speziesabhängigen Unterschiede in der Verteilung der Enzymaktivitäten entgegenstehen. Während beim Menschen 5'-Nase in Keimzentren und Lymphozytenmänteln der Sekundärfollikel nachgewiesen wird, ist die alkalische Phosphatase-Aktivität auf den Bereich der PALS und der Marginalzonen beschränkt. Das Gebiet der ATPase-Aktivität umfaßt die Lymphozytenmäntel der Sekundärfollikel und die Marginalzonen (MÜLLER-HERMELINK 1974; MÜLLER-HERMELINK et al. 1976). Die Verteilung der Enzymaktivitäten der alkalischen Phosphatase und 5'-Nase beim Schwein hat eine zu den Verhältnissen des Menschen inverse Verteilung ergeben; die Gebiete der ATPase-Aktivität decken sich ebenfalls nicht. Auch für verschiedene andere Spezies sind aus der Literatur arteigene Verteilungsmuster dieser Enzymaktivitäten bekannt, die sich mit denen des Schweines nur partiell decken.

Ein weiterer funktioneller Aspekt für die untersuchten Enzyme ergibt sich aus der Überlegung, daß phosphorylierte Verbindungen von Zellen nach Abspaltung der Phosphatreste besser aufgenommen werden können.

Da zu den Substraten Nukleosidmono-, -di- und -triphosphate zählen, ist es denkbar, daß die Enzyme diese als Grundbausteine der DNS-Synthese dephosphorylieren und die Nukleoside dann von den enzymaktiven Zellen selbst oder von den umgebenden Lymphozyten aufgenommen werden. Damit steht die Beobachtung von KLAUSHOFER et al. (1973) in Einklang, wonach bei der Maus embryonal während der Ösophagus-Entwicklung 5'-Nase-Aktivität an den Zellmembranen von Epithelzellen und glatten Muskelzellen vorliegt. Dagegen besitzt der Ösophagus erwachsener Individuen nur geringe 5'-Nase-Aktivität. Wegen der geringen Konzentrationen von Phosphorsäu-

reestern im Blut besitzt diese Vorstellung aber nur geringe Wahrscheinlichkeit.

Auch eine direkte Beeinflussung der Plasmalemmoberfläche von Lymphozyten durch die untersuchten Enzyme ist unwahrscheinlich, weil enge Kontakte zwischen den Lymphozyten und den untersuchten nichtlymphatischen Zellen nicht beobachtet wurden.

In der Literatur ist verschiedentlich auch ein Zusammenhang zwischen den hier untersuchten Enzymen und Transportvorgängen diskutiert worden, ebenso wie ein Einfluß dieser Enzyme auf Plasmalembbewegungen (HARDONK 1968; KOUVALAINEN 1971; BADER 1981). Diese Überlegungen würden sich zwar gut in die Vorstellungen von VAN ROOIJEN (1977) einfügen, wonach Immunkomplexe an der Oberfläche ortsständiger nichtlymphatischer Zellen von der Marginalzone in die Follikel hineintransportiert werden, jedoch stehen auch hierfür experimentelle Indizien aus.

Mit den gleichen Vorbehalten müssen auch Beziehungen der alkalischen Phosphatase zur Fibrillogenese von FRZ betrachtet werden, wie sie von MÜLLER-HERMELINK et al. (1976) für die Milz des Menschen vermutet worden sind. Diese Vorstellung wird durch die Tatsache in Frage gestellt, daß neben dem Schwein auch andere Spezies keine alkalische Phosphatase-Aktivität an FRZ aufweisen, sondern 5'-Nase-Aktivität (KOUVALAINEN 1971; CATAYÉE und CHALET 1979).

Die funktionelle Bedeutung der alkalischen Phosphatase und der 5'-Nase an Blutgefäßendothelien bleibt ebenfalls rätselhaft. Auch hier zeigen sich auffällige speziesabhängige Unterschiede.

Während beim Schwein innerhalb der Gefäßstrecke zwischen den kleineren Trabekelarterien und den SCHWEIGGER-SEIDELschen Hülsenkapillaren Abschnitte hoher Aktivität mit inaktiven Segmenten wechseln, finden sich beim Menschen in allen Gefäßabschnitten einschließlich der Trabekelarterien hohe Aktivitäten der alkalischen Phosphatase (LI et al. 1977).

Trotz der unbefriedigenden funktionellen Deutung der dargestellten Enzymaktivitäten bleibt die hohe Spezifität der nachgewiesenen Verteilungsmuster im Hinblick auf die Kompartimente der weißen Pulpa eine bemerkenswerte Tatsache, die auf eine enge Wechselwirkung zwischen den nicht-lymphatischen akzessorischen Zellen und den Lymphozyten hinweist.

5. Zusammenfassung

In der weißen Milzpulpa des Schweines wurden die Enzymaktivitäten der alkalischen Phosphatase und 5'-Nukleotidase licht- und elektronenmikroskopisch mit histochemischen Nachweistechniken untersucht. Da beide Enzyme hier nur sehr niedrige Aktivitäten aufweisen, mußten die Inkubationsmedien zunächst den Erfordernissen der ultrahistochemischen Nachweise angepaßt werden.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist im Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel am Plasmalemm nichtlymphatischer Zellen lokalisiert. Diese Zellen besitzen morphologische Gemeinsamkeiten mit dendritischen und fibroblastischen Retikulumzellen.

Die Aktivität der 5'-Nukleotidase in der periarteriolären lymphatischen Scheide kann dem Plasmalemm fibroblastischer Retikulumzellen zugeordnet werden, die hier ein Grundgerüst bilden. Im Grenzgebiet zwischen dem Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel und der Marginalzone befindet sich eine Zone, deren 5'-Nukleotidase-Aktivität ebenfalls dem Plasmalemm fibroblastischer Retikulumzellen zugeordnet werden kann. Sie steht in Kontakt mit den enzymaktiven Strukturen der periarteriolären lymphatischen Scheide. Auf Grund der Tatsache, daß ihre Lymphozyten nur teilweise B-Lymphozyten darstellen sowie über einen Vergleich mit den Verhältnissen in der weißen Pulpa der menschlichen Milz wurde diese Zone als Fortsetzung der periarteriolären lymphatischen Scheide auf die Follikeloberfläche gedeutet.

Für die Funktion der untersuchten Enzymaktivitäten wird ein Einfluß auf die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus in der weißen Pulpa sowie eine Wirkung als Schranke gegenüber Substanzen diskutiert, die mit dem Blut der Marginalzone an die weiße Pulpa herangetragen werden.

Summary

In the splenic white pulp of swine the distribution of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase was investigated histochemically by means of light and electron microscopy. Both enzymes show very low activities, so that the availability of the techniques for ultrastructural demonstration first had to be improved.

Alkaline phosphatase activity has been shown to localize in the mantle zone of secondary follicles associated with the plasmalemmata of non-lymphatic cells. These possess features of both dendritic reticulum cells and fibroblastic reticulum cells.

In the periarterial lymphatic sheath 5'-nucleotidase activity is localized on the plasmalemmata of fibroblastic reticulum cells which form a framework in this compartment. In the border-district between the mantle zone of the secondary follicles and the marginal zone there is a zone of 5'-nucleotidase-positive fibroblastic reticulum cells which communicates with the periarterial lymphatic sheath. Only some of the lymphocytes of this zone are B-cells. These facts and the similar construction of human splenic white pulp suggest, that this zone represents a continuation of the periarterial lymphatic sheath on the surface of the follicles.

Also taken into consideration is the influence of the investigated zonal arrangement of enzyme activities on the composition of the extracellular fluid of the white pulp as well as a barrier-effect with respect to substances which are carried along with the blood-flow of the marginal zone.

6. A b b i l d u n g e n

Abb. 1

Darstellung der alkalischen Phosphatase-Aktivität in der weißen Pulpa mit der modifizierten Technik nach HUGON und BORGERS; Semidünnschnitt.

Die Lymphozytenmantelzone des Sekundärfollikels (A) weist ein feines Netz enzymaktiver Strukturen auf. Dabei bleibt im Grenzgebiet zur PALS (B) ein Segment frei von Aktivität (C).

Deutliche Enzymaktivität zeigt das Endothel der Follikelarterie (D) ebenso wie das einer Hülsekapillare (E).

Am Endothel der Zentralarterie (F) ist nur schwache Aktivität vorhanden.

Vergrößerung 290 x

Abb. 2

Darstellung der alkalischen Phosphatase-Aktivität in der weißen Pulpa mit der modifizierten Technik nach HUGON und BORGERS; Semidünnschnitt.

Der Lymphozytenmantel (A) eines Sekundärfollikels zeigt Aktivität an linearen Strukturen. Im Keimzentrum (B) läßt sich keine Aktivität nachweisen.

Vergrößerung 460 x



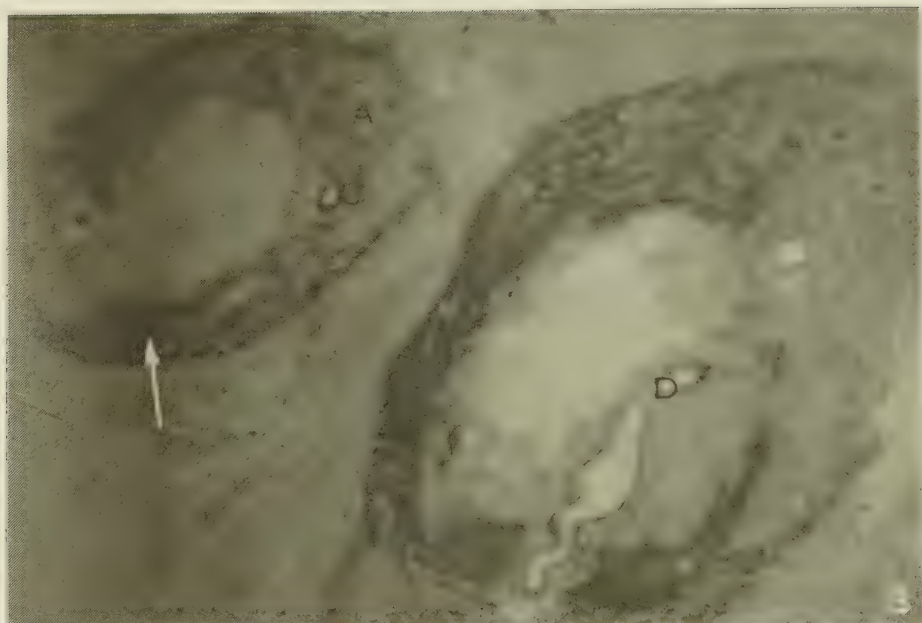


Abb. 3

Darstellung der 5'-Nase-Aktivität in der weißen Pulpa nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER; Semidünnschnitt.

Das grobmaschige Netz enzymaktiver Strukturen, welches die PALS (A) charakterisiert, setzt sich auf die Oberfläche der Sekundärfollikel fort (B). Die enzymaktiven Strukturen zeigen hier deutlich oberflächenparallele Ausrichtung (Pfeil).

Positiv reagieren auch die Endothelien der Zentralarterie (C) und der Follikelarterie (D).

Vergrößerung 110 x

Abb. 4

Verteilung der alkalischen Phosphatase-Aktivität und der 5'-Nase-Aktivität in der weißen Pulpa, Techniken nach STUTTE sowie nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER; Semidünnschnitt.

Alkalische Phosphatase-Aktivität findet sich am Endothel der Zentralarterie (A), im Lymphozytenmantel der Sekundärfollikel (B) und in den Granulozyten der Marginalzone (C). 5'-Nase-Aktivität liegt peripher des Lymphozytenmantels der Sekundärfollikel. Die follikuläre Zone der 5'-Nase-Aktivität (D) steht in Verbindung mit 5'-Nase-positiven Strukturen der PALS (E). Auch die Zentralarterie zeigt starke Aktivität am Endothel.

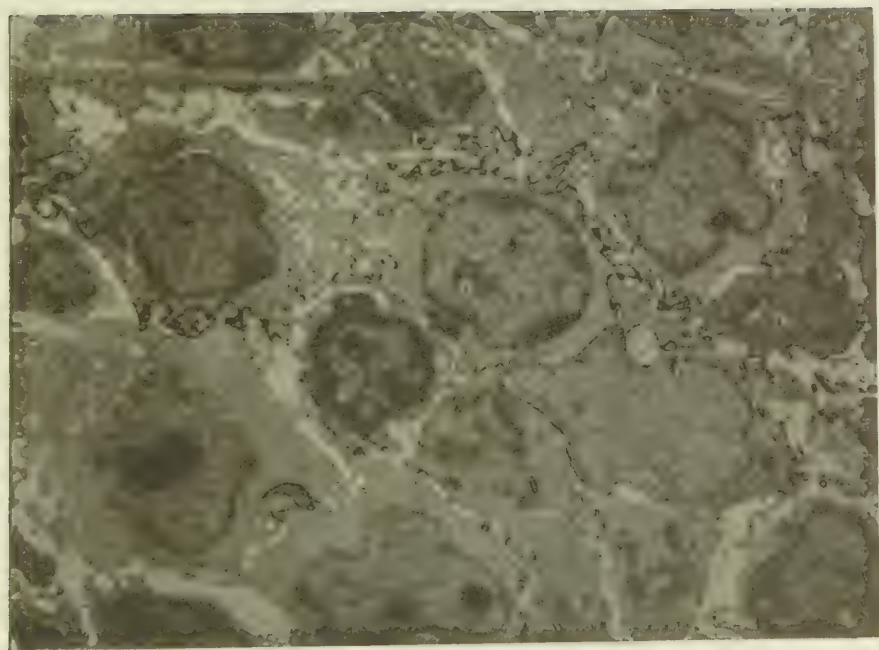
Vergrößerung 110 x

Abb. 5

Alkalische Phosphatase-Aktivität im Lymphozytenmantel eines Sekundärfollikels, Technik nach HUGON und BORGERS, Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Die helle nichtlymphatische Zelle läßt sich aufgrund ihrer unregelmäßigen Kernform (A) gut von den umgebenden Lymphozyten (B) unterscheiden. Zwischen den Zellen liegt ein Netz feiner enzymaktiver Fortsätze (Pfeil).

Vergrößerung 4 500 x



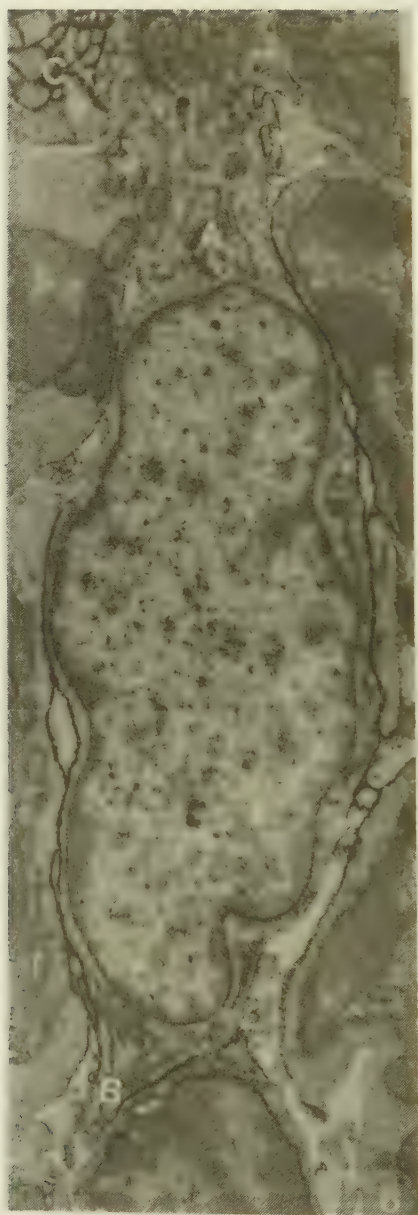


Abb. 6

Helle nichtlymphatische Zelle des Lymphozytenmantels.
Alkalische Phosphatase-Aktivität, Technik nach HUGON und
BORGERS, Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Der Kern der hellen Zelle zeigt im Gegensatz zu den Kernen
der umgebenden Lymphozyten nur wenig Heterochromatin.
Während die Lateralseiten des Kernes nur von einem schma-
len Zytoplasmasaum umgeben sind, liegt an einem Pol
des Kernes eine größere Menge organellenreichen Grund-
plasmas (A). Am entgegengesetzten Pol verläßt ein Fort-
satz das Perikaryon (B). Die Fortsätze gehen in feine
Fortsätzchen über (C).

Vergrößerung 11 000 x

Abb. 7

Alkalische Phosphatase-Aktivität an Fortsätzen heller nichtlymphatischer Zellen des Lymphozytenmantels. Technik nach HUGON und BORGERS, Blockkontrastierung nach KARNOVSKY .

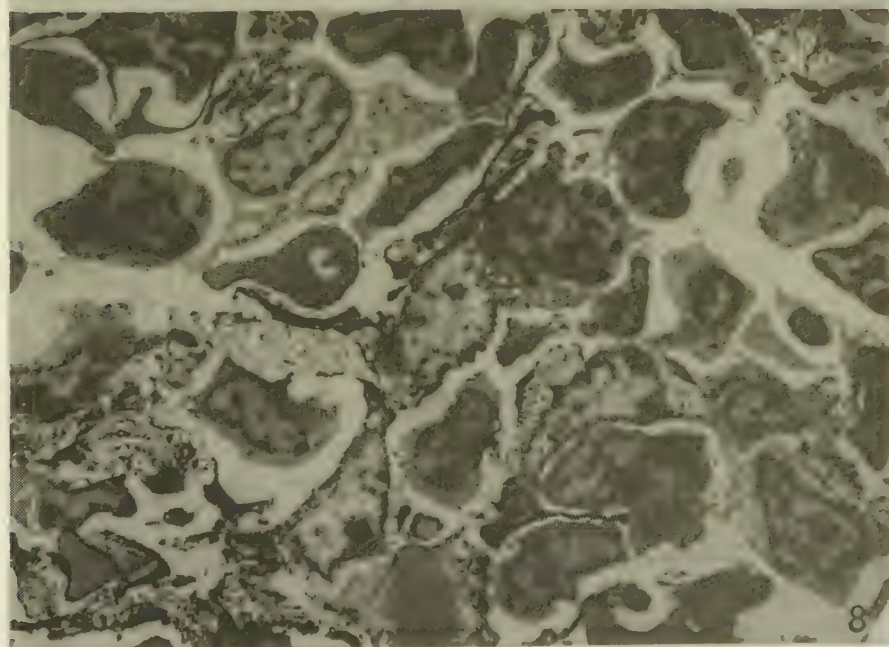
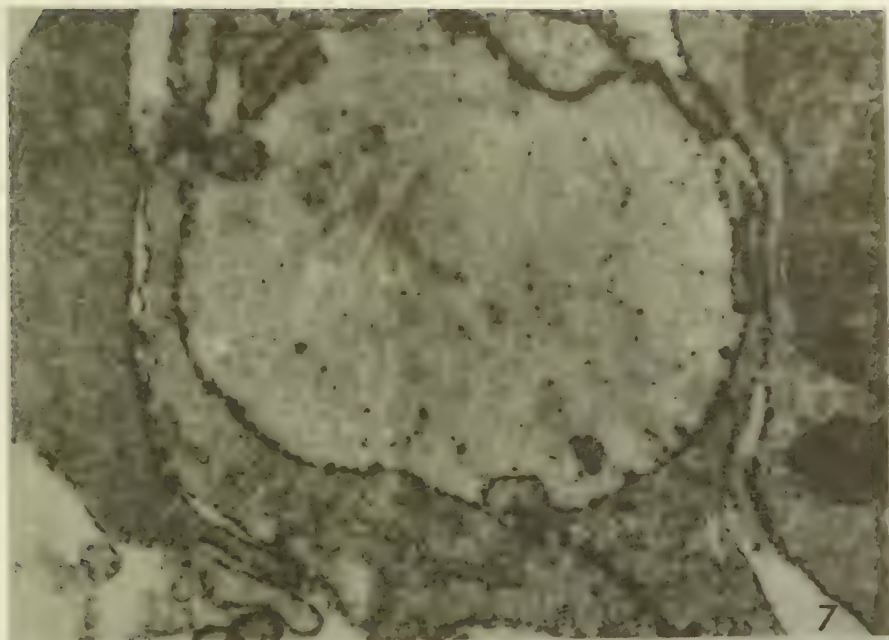
Die Fortsätze umschließen ein Bündel extrazellulären Faser-materials, in dem kollagene Mikrofibrillen im Längs- und Querschnitt zu erkennen sind.

Vergrößerung 31 000 x

Abb. 8

5'-Nase-Aktivität an Zellen und Fortsätzen innerhalb der PALS. Technik nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER, Blockkontrastierung nach KARNOVSKY .

Vergrößerung 4 500 x



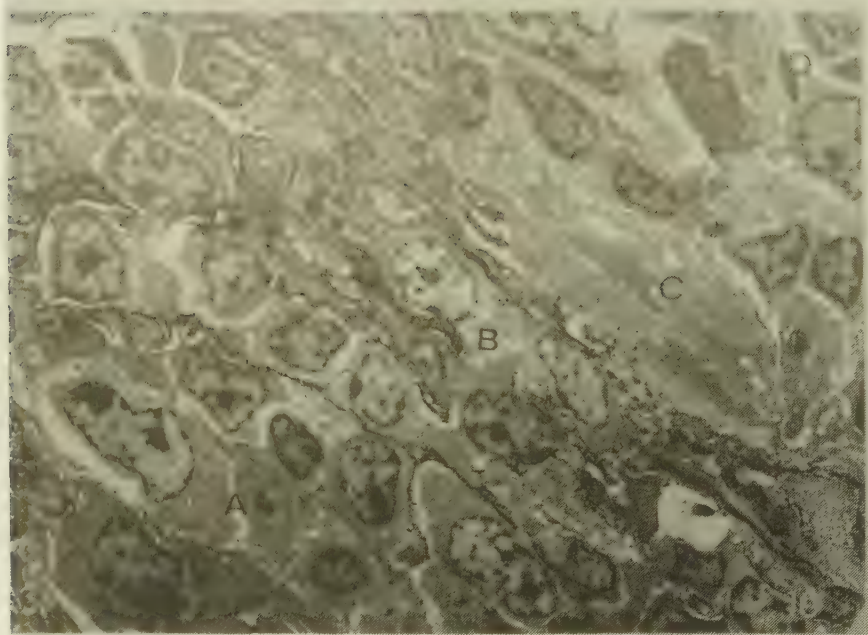
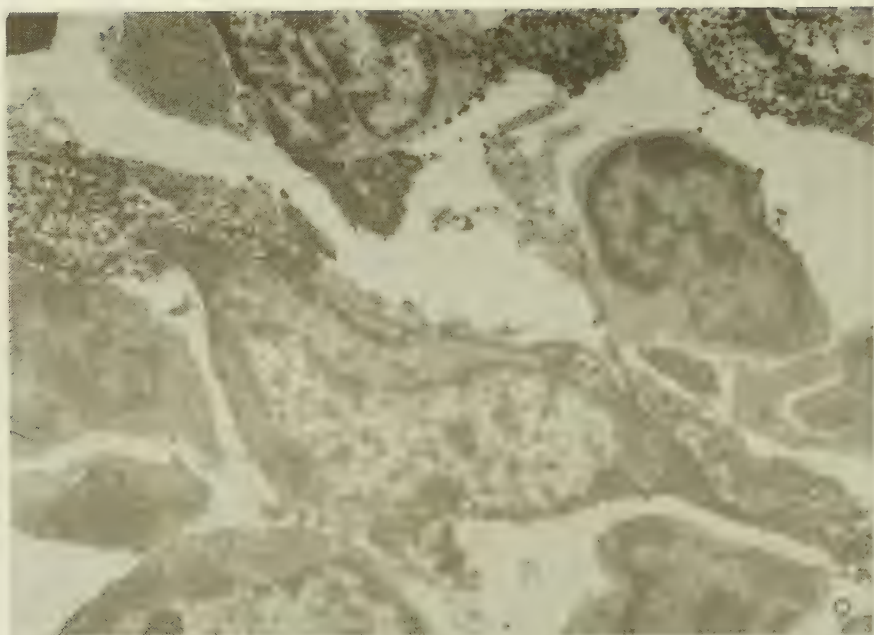


Abb. 9

Nichtlymphatische Zelle aus der PALS.

Technik nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER, Blockkontrastierung nach KARNOVSKY .

Die Zelle weist starke 5'-Nase-Aktivität auf, während die umgebenden Lymphozyten negativ bleiben.

Vergrößerung 8 500 x

Abb. 10

5'-Nase-positive Zone im Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone.

Technik nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER, Blockkontrastierung nach KARNOVSKY :

Zone der Mantellymphozyten (A), 5'-Nase-positive Grenzzone (B), glatte Muskulatur (C), Marginalzone (D).

Vergrößerung 1 500 x

Abb. 11

5'-Nase-positive nichtlymphatische Zelle aus dem Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone.

Technik nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER, Blockkontrastierung nach KARNOVSKY .

Die Zelle besitzt spindelige Gestalt und zeigt deutliche Aktivität am Plasmalemm.

Vergrößerung 11 000 x

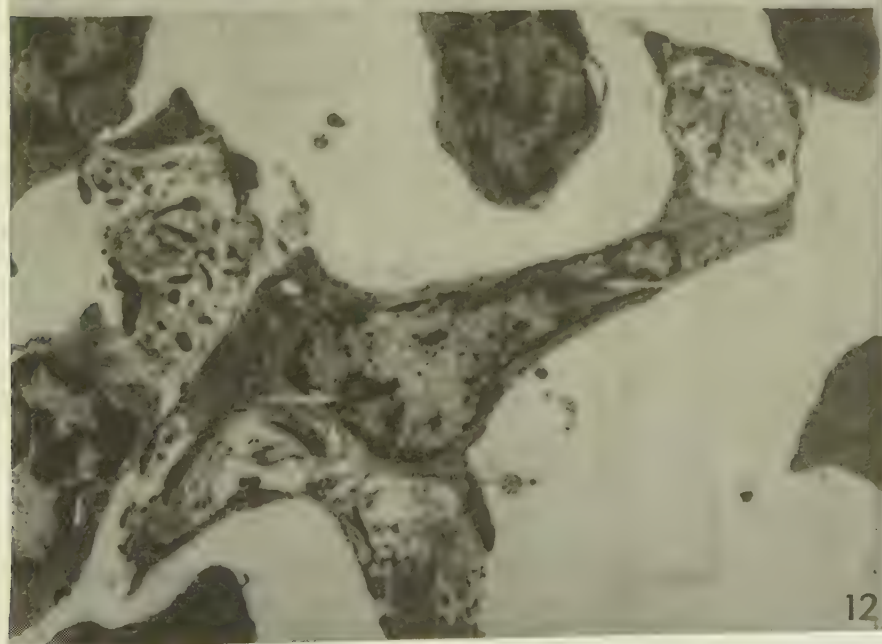
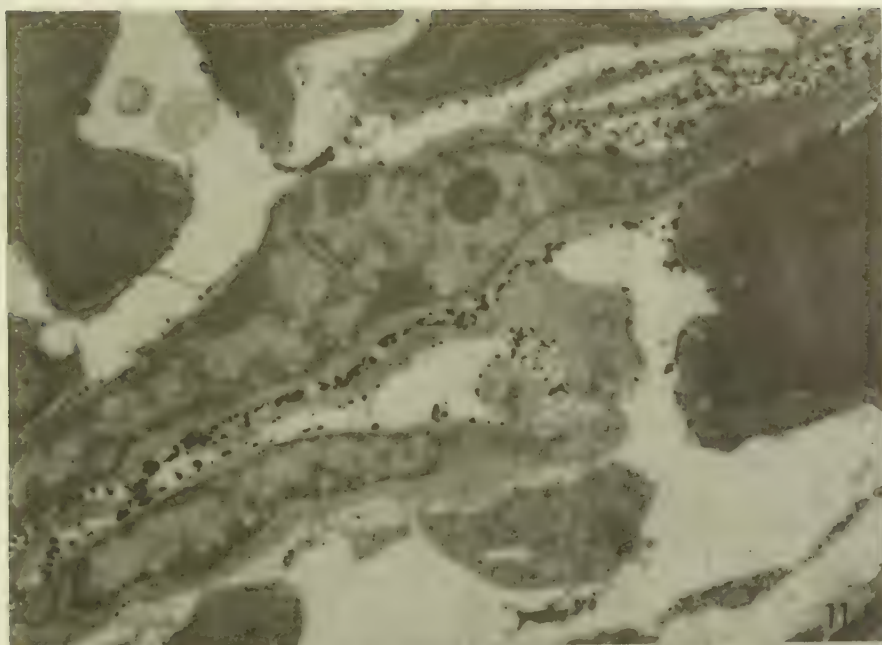
Abb. 12

Nichtlymphatische Zelle aus der zentralen PALS.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY .

Der Kern der Zelle ist stark gekerbt (Pfeil). Die Fortsätze umschließen Bündel extrazellulären Materials.

Vergrößerung 9 000 x



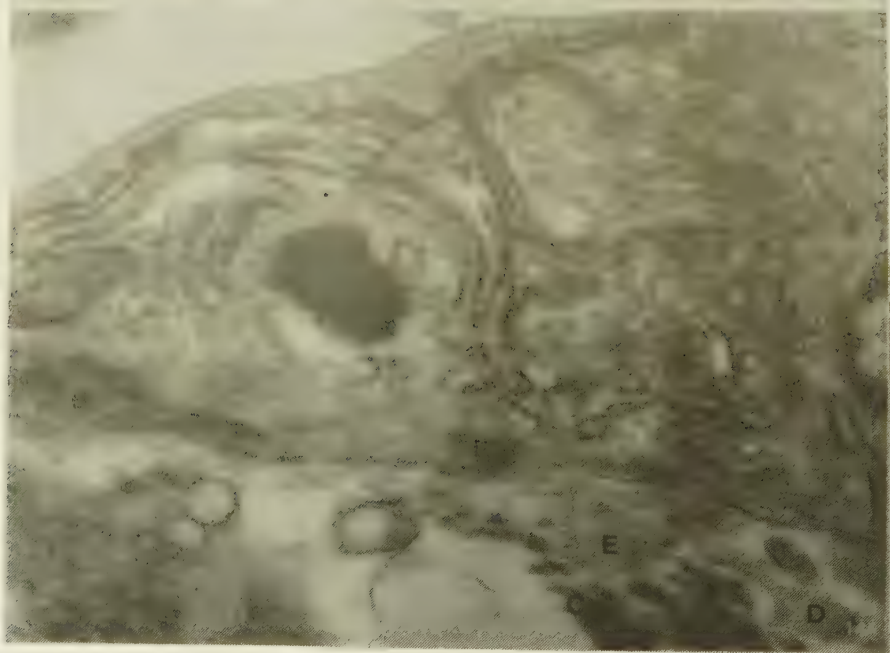
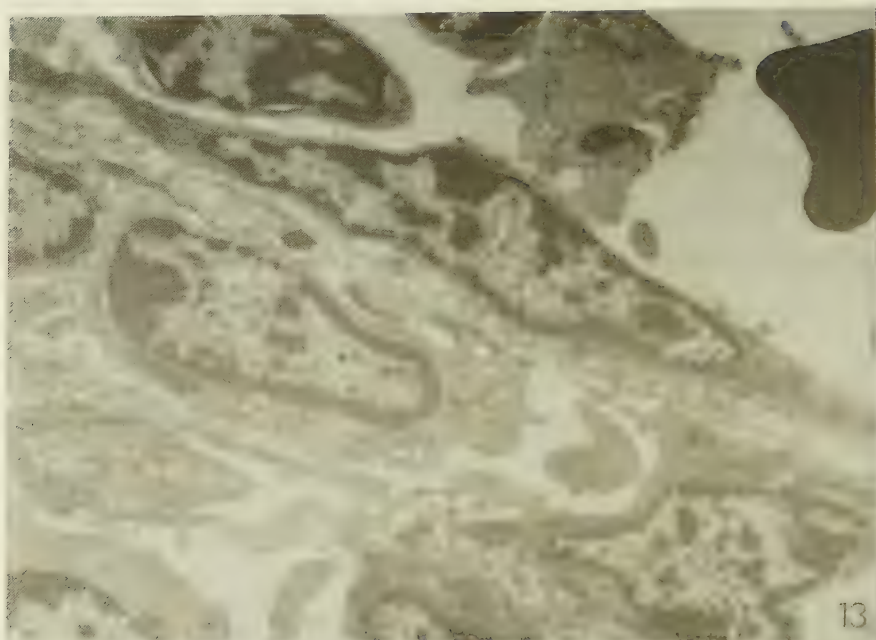


Abb. 13

Nichtlymphatische Zelle aus dem Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Die Zelle zeigt deutlich spindelige Form. Das extrazelluläre Material enthält neben kollagenen Mikrofibrillen einzelne elastische Fasern (Pfeil).

Vergrößerung 8 500 x

Abb. 14

Nichtlymphatische Zelle aus dem Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Der Zellpol enthält den gut entwickelten Golgi-Apparat sowie leicht erweitertes rauhes endoplasmatisches Retikulum. In der Nähe des Golgi-Apparates liegen ein multivesikulärer Körper (A) sowie ein Lysosom. Unter dem Plasmalemm befinden sich intrazelluläre Filamentbündel, die von elektronendichten Knoten durchsetzt sind (B). Das extrazelluläre Material setzt sich zusammen aus kollagenen Mikrofibrillen (C), elastischen Fasern (D) und feinen Mikrofibrillen ohne Periodizität (E).

Vergrößerung 38 500 x

Abb. 15

Fortsätze nichtlymphatischer Zellen aus dem Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Das Grundplasma der Fortsätze wird von Mikrofilamenten ausgefüllt. Diese finden Anschluß an elektronendichte Knoten (A) und Plasmalemmaauflagerungen (B). Die Fortsätze sind durch Kontakteinrichtungen verknüpft (C). In erweiterten Interzellularspalten wird amorphes Material mittlerer Elektronendichte (D) gefunden.

Vergrößerung 74 000 x

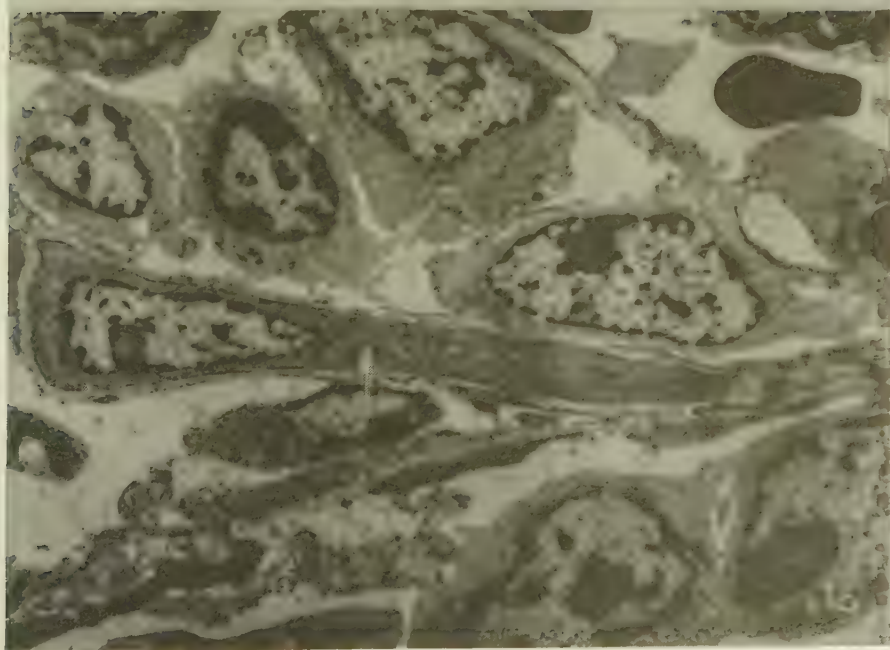
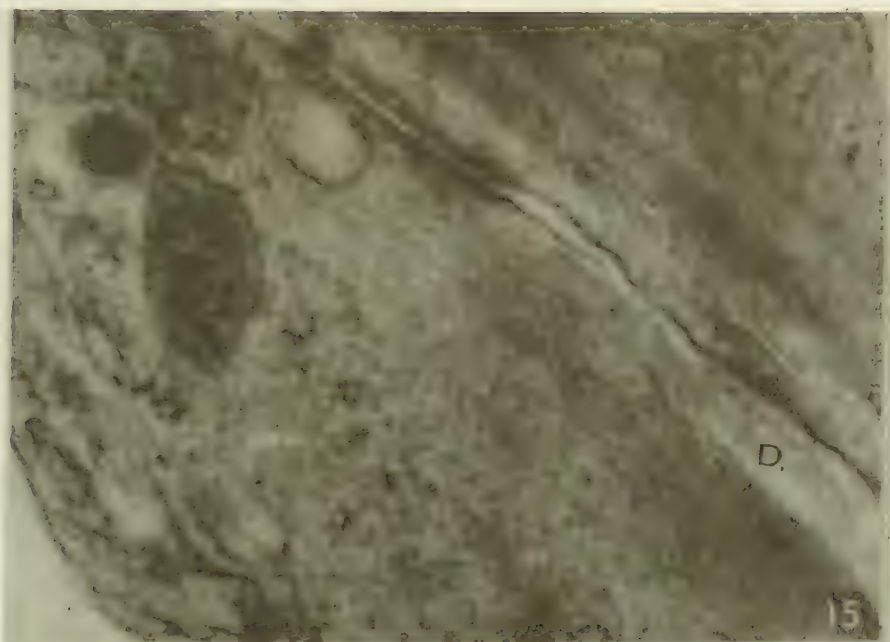
Abb. 16

Glatte Muskelzelle aus dem Grenzgebiet zwischen Follikel und Marginalzone, peripher der 5'-Nase-positiven Zone.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Glatte Muskelzellen unterscheiden sich von den nichtlymphatischen Zellen durch die deutlich stärkere Einlagerung intrazytoplasmatischer Filamente, elektronendichter Knoten und Plasmalemmaauflagerungen. Zellorganellen werden nur in einem kleinen Bereich des Zelleibes angetroffen (Pfeil).

Vergrößerung 4 000 x



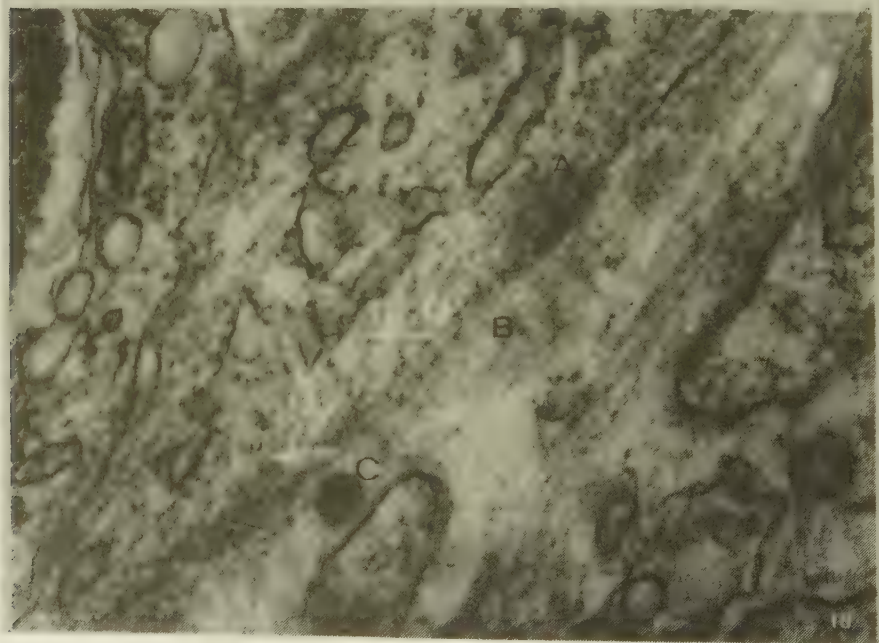
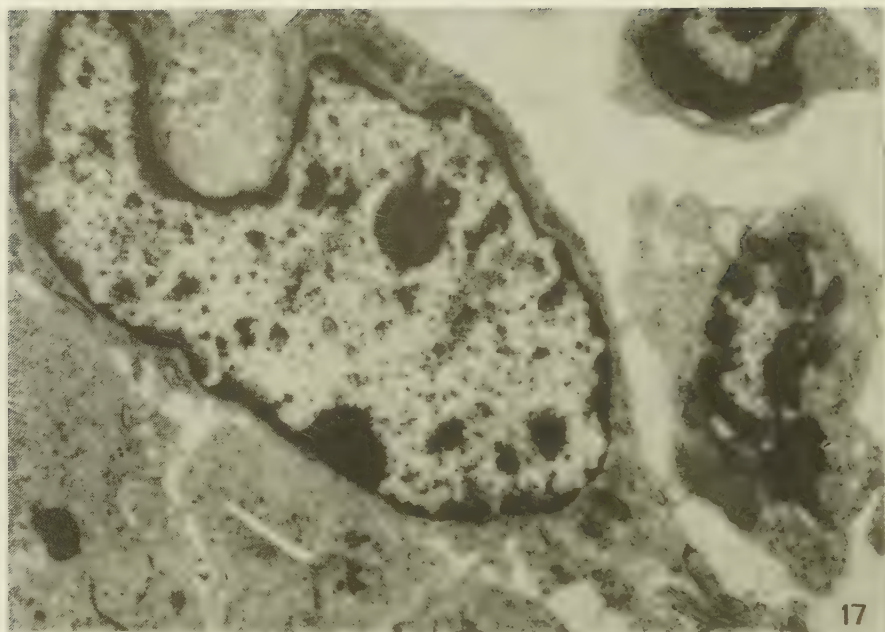


Abb. 17

Helle nichtlymphatische Zelle aus dem Lymphozytenmantel.
Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Der gebuchtete Kern enthält einen deutlichen Nukleolus,
grobscholliges und feindisperses Chromatin. In der Zell-
bucht liegt ein Bündel extrazellulären Materials.

Vergrößerung 12 500 x

Abb. 18

Fortsatz einer hellen nichtlymphatischen Zelle aus dem
Lymphozytenmantel.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

In das helle Grundplasma sind Filamente eingelagert, die
spitzwinklig auf das Plasmalemm zulaufen (Pfeile) oder
an elektronendichte Auflagerungen Anschluß finden (A).
Der Fortsatz enthält kurze Abschnitte von rauhem ER.
Extrazellulär liegt ihm amorphes Material an (B);
virusartiger Partikel (C).

Vergrößerung 77 000 x

Abb. 19

Feine Fortsätze heller nichtlymphatischer Zellen aus dem Lymphozytenmantel.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

In einem größeren Fortsatz sind kurze Abschnitte rauhen ERs (Pfeil) sichtbar, ferner intrazytoplasmatische Filamente. Die Fortsätze bilden untereinander Kontaktpunkte aus.

Vergrößerung 64 500 x

Abb. 20

Kontakteinrichtung zwischen Fortsätzen heller nichtlymphatischer Zellen aus dem Lymphozytenmantel.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Das innere Plasmalemmblatt im Bereich der Kontakteinrichtung erscheint verdickt und besitzt dunkle Auflagerungen, in die Filamente aus dem Grundplasma hineinziehen.

Vergrößerung 71 000 x



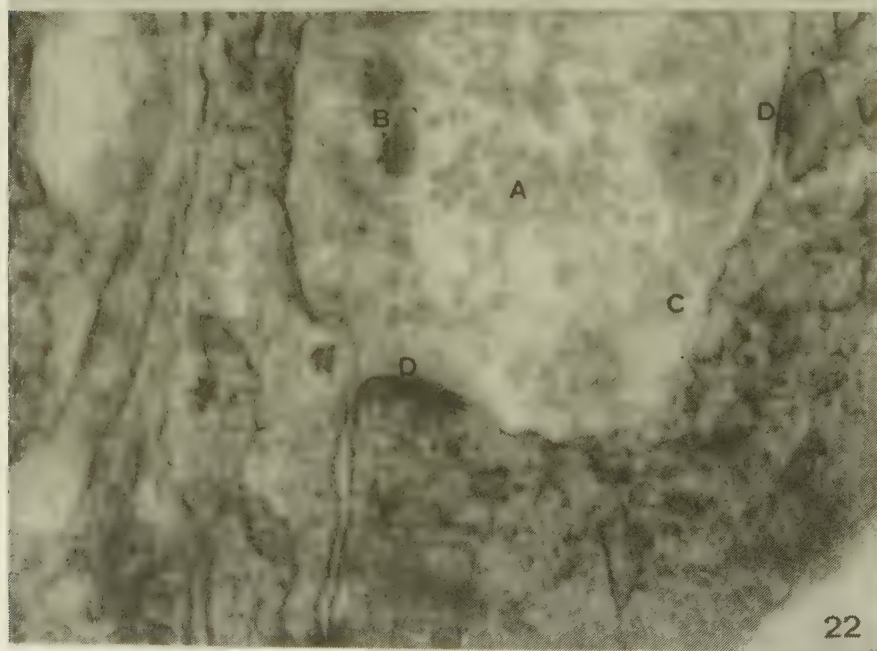
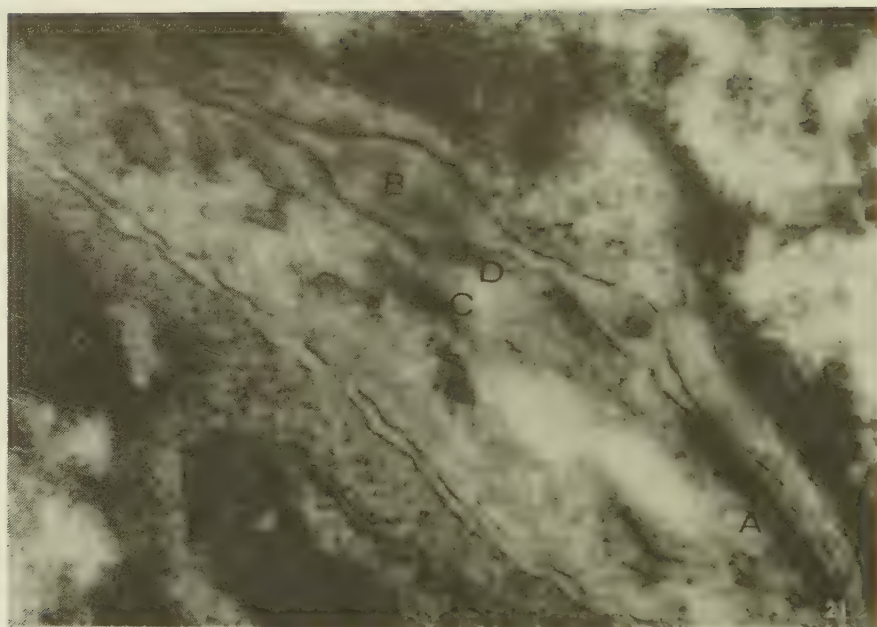


Abb. 21

Ausgedehnte Kontakteinrichtung (A) am Perikaryon einer hellen nichtlymphatischen Zelle aus dem Lymphozytenmantel.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Der erweiterte Interzellularspalt ist mit Material mittlerer Elektronendichte gefüllt (B). Innerhalb des Zellfortsatzes finden sich elektronendichte Bezirke (C) und Auflagerungen am Plasmalemm (D).

Vergrößerung 51 000 x

Abb. 22

Fortsätze heller nichtlymphatischer Zellen aus dem Lymphozytenmantel.

Blockkontrastierung nach KARNOVSKY.

Die Fortsätze umschließen ein Bündel extrazellulären Materials. In ihm lassen sich kollagene Mikrofibrillen (A), elastische Fasern (B) und amorphes Material (C) unterscheiden. Zum extrazellulären Material werden Kontakte ausgebildet, deren Struktur an Hemidesmosomen erinnert (D).

Vergrößerung 68 000 x

Abb. 23

Darstellung von oberflächenassoziiertem IgM in der weißen Pulpa.

Indirekter Immunfluoreszenznachweis nach GUTMAN und WEISSMAN.

Das Keimzentrum (A) enthält nur einzelne fluoreszierende Strukturen. Der Lymphozytenmantel (B) ist von Zellen mit starker Fluoreszenz des Plasmalemmes besiedelt. An der Peripherie des Follikels liegen lineare Strukturen mit unspezifischer Fluoreszenz (Pfeil). Die Marginalzone (C) zeigt einzelne Zellen mit zytoplasmatischer Fluoreszenz (*), ebenso die PALS (D).

Vergrößerung 170 x

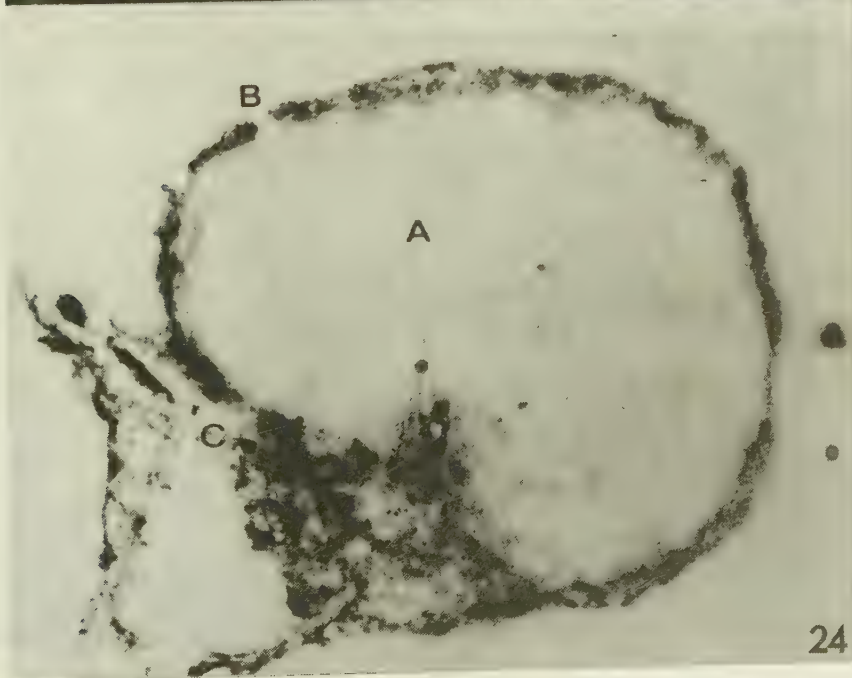
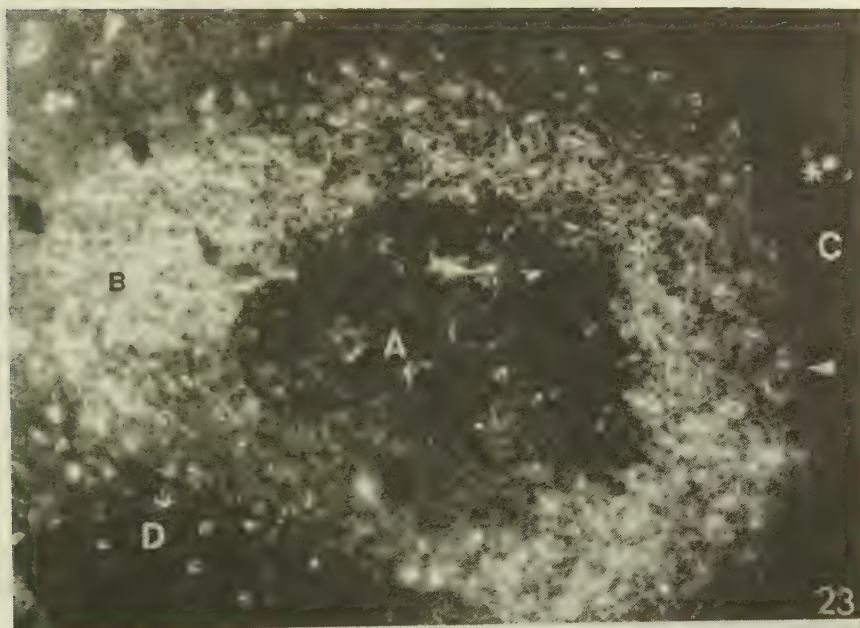
Abb. 24

5'-Nase-Verteilung in dem Schnitt von Abb. 23.

Technik nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER.

Die 5'-Nase-Aktivität liegt im Grenzgebiet zwischen Follikel (A) und Marginalzone (B) sowie in der PALS (C).

Vergrößerung 140 x



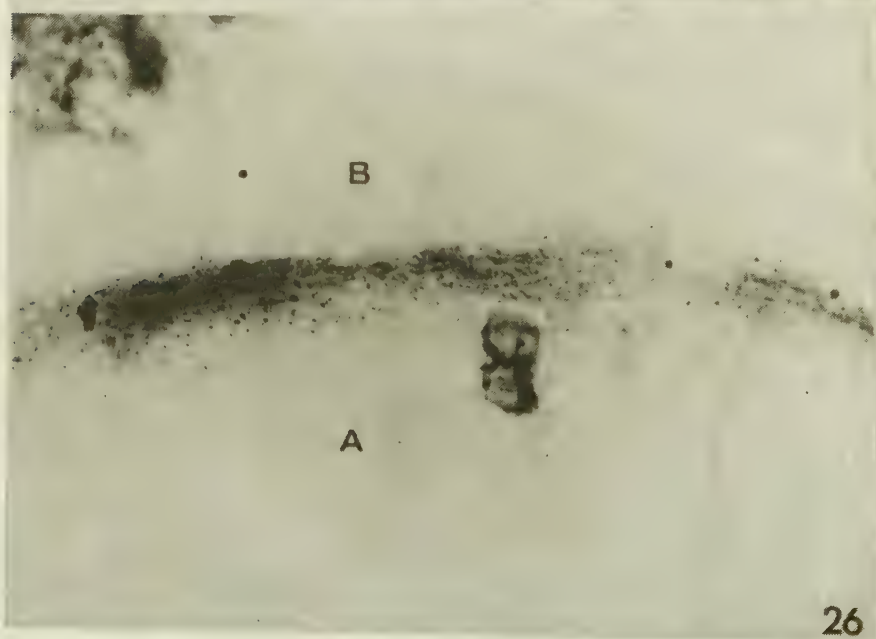
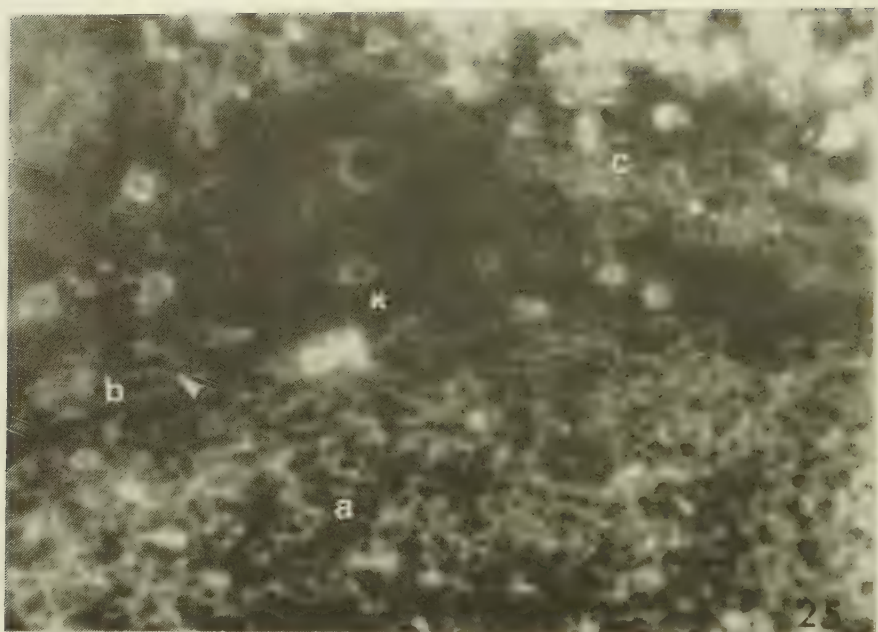


Abb. 25

Darstellung von oberflächenassoziiertem IgM in der weißen Pulpa.

Indirekter Immunfluoreszenznachweis nach GUTMAN und WEISSMAN.

Der Lymphozytenmantel (A) ist von Zellen mit spezifischer Fluoreszenz am Plasmalemm besiedelt. An der Grenze zwischen Lymphozytenmantel und Marginalzone liegen lineare Strukturen mit unspezifischer Fluoreszenz (B), die Zellen mit Fluoreszenz am Plasmalemm (Pfeil) und solche, die sich nicht darstellen lassen (*), einschließen.

In der Marginalzone (C) liegen neben Zellen, die Fluoreszenz am Plasmalemm zeigen, auch solche mit zytoplasmatischer Fluoreszenz.

Vergrößerung 420 x

Abb. 26

5'-Nase-Verteilung in dem Schnitt von Abb. 25.

Technik nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER.

Die 5'-Nase-Aktivität liegt im Grenzgebiet zwischen Follikel (A) und Marginalzone (B). Sie deckt sich mit den unspezifisch fluoreszierenden linearen Strukturen von Abb. 25.

Vergrößerung 350 x

7. Literaturverzeichnis

ABE, K., ITO, T.:

Fine structure of germinal centers of the splenic lymphatic tissue of the mouse, with special reference to the occurrence of peculiar intercellular globules in the light zone.

Virchows Arch. Abt. B, Zellpath. 12, 259-272 (1972).

BADER, G.:

Über das Vorkommen der alkalischen Phosphatase-, 5'-Nukleotidase- und Mg^{2+} -Adenosintriphosphatase-Aktivität in der weißen Milzpulpa des Schweines.

Berlin: Inaug. Diss. Journal Nr. 1046 (1981).

BAILIFF, R.N.:

Splenic reactions to colloidal thorium dioxide in the albino rat.

Am. J. Anat. 92, 55-115 (1953).

BARKA, T., ANDERSON, P.J.:

Histochemistry, theory, practice and bibliography.

Hoeber Medical Division, New York, Evanstone and London (1963).

BARRON, K.D., BOSCHES, R.:

Histochemical demonstration of 5'-nucleotidase in the central nervous system. Effects of manganous ion and pH.

J. Histochem. Cytochem. 9, 455-457 (1961)

BELLOWS, C.G., MELCHER, A.H., BHARGAVA, U., AUBIN, J.E.:
Fibroblasts contracting three-dimensional collagen gels
exhibit ultrastructure consistent with either contraction
or protein secretion.

J. Ultrastruct. Res. 48, 179-192 (1982).

BENNETT, H.S., LUFT, J.H.:

S-collidine as a basis for buffering fixatives.

J. biophys. biochem. Cytol. 6, 113-114 (1959).

BERNEY, S.N., GESNER, B.M.:

The circulatory behaviour of normal and enzyme altered
thymocytes in rats.

Immunology 18, 691-691 (1970).

BLUE, J., WEISS, L.:

Species variations in the structure and function of the
marginal zone - an electron microscope study of the cat
spleen.

Am. J. Anat. 161, 169-187 (1981 a).

BLUE, J., WEISS, L.:

Electron microscopy of the red pulp of the dog spleen
including vascular arrangements, periarterial macrophage
sheath (ellipsoids) and the contractile innervated
reticular meshwork.

Am. J. Anat. 161, 189-218 (1981 b).

BORGERS, M., THONÉ, F.:

The inhibition of alkaline phosphatase by L-p-bromotetrami-
sole.

Histochemistry 44, 277-280 (1975).

BROWN, J., HARRIS, G., PAPA-MICHAIL, M., SLIVJIC, V.S.,
HOLBORROW, E.J.:

The localisation of aggregated human gamma globulin in
the spleens of normal mice.

Immunology 24, 955-968 (1973).

BURGER, R.M., LOWENSTEIN, J.M.:

Preparation and properties of 5'-nucleotidase from smooth
muscle of small intestine.

J. biol. Chem. 245, 6274-6280 (1970).

BURGER, R.M., LOWENSTEIN, J.M.:

5'-Nucleotidase from smooth muscle of small intestine
and from brain. Inhibition by nucleotides.

Biochemistry 14, 2362-2366 (1975).

BURKE, J.S., SIMON, G.I.:

Electron microscopy of the spleen. II. Phagocytosis of
colloidal carbon.

Am. J. Path. 58, 157-181 (1970).

CATAYÉE, G., CHALET, M., KOCHOYAN, Y.:

Histoenzymologie, comportement de cellules réticulaires
à activités enzymatiques différentes dans la pulpe blanche
splénique du rat après une forte stimulation antigénique.

C. R. Soc. Biol. 167, 1870-1872 (1973).

CATAYÉE, G., CHALET, M., KOCHOYAN, Y.:

Place des cellules réticulaires à activités enzymatiques
déterminées dans le développement de la pulpe blanche
splénique du rat.

C. R. Soc. Biol. (Paris) 165, 1017-1020 (1974).

CATAYÉE, G., CHALET, M., KOCHOVAN, V.:

Immunologie - les particularités de l'action cortisonique sur les éléments lymphoréticulaires à activité enzymatique spécifique de la pulpe blanche splénique du rat.

C. R. Acad. Sci. (Paris) 280, 2509-2511 (1975).

CATAYÉE, G., CHALET, M.:

Hématopoïese et modifications du SRE de la pulpe blanche splénique du rat porteur d'un fibrosarcome.

Bull. Assoc. Anat. (Nancy) 63, 185-190 (1979).

CHEN, L.L., ADAMS, J.C., STEINMAN, R.M.:

Anatomy of germinal centers in mouse spleen, with special reference to "follicular dendritic cells".

J. Cell. Biol. 77, 148-164 (1978).

DAVIES, K.J., GARRETT, J.R.:

Improved preservation of alkaline phosphatase in salivary glands of the cat.

in: Fixation in histochemistry; STOWARD, P.J., Chapman and Hall London (1973).

DEIMLING, O.H. von:

Die Darstellung phosphatfreisetzender Enzyme mittels Schwermetall-Simultan-Methoden.

Histochemie 4, 48-55 (1964).

DEL CERRO, M., COGEN, J., DEL CERRO, C.:

Stevenel's Blue, an excellent stain for optical microscopical study of plastic embedded tissues.

Microscopica Acta 83, 117-121 (1980).

EDWARDS, N.L., GELFAND, E.W., BURK, L., DOSCH, H.M.,
FOX, I.H.:

Distribution of 5'-nucleotidase in human lymphoid tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3474-3476 (1979).

EICKELENBOOM, P., LEVENBACH, M.G.E., VAN DEN BRINK, H.R.,
STREEFKERK, J.G.:

Development of T and B cell areas in peripheral lymphoid
organs of the rat.

Anat Rec. 194, 523-538 (1979).

EICKELENBOOM, P.:

Dendritic cells in rat spleen follicles: a combined
immuno- and enzyme histochemical study.

Cell Tissue Res. 190, 79-87 (1978).

EWIJK, W. van, VERZIJDEN, J.H.M., VAN DER KWAST, TH. H.,
LUIJCKX-MEIJER, S.W.M.:

Reconstitution of the thymus dependent area in the spleen
of lethally irradiated mice.

Cell Tissue Res. 149, 43-60 (1974).

EWIJK, W. van, ROZING, J., BRONS, N.H.C., KLEPPER, D.:

Cellular events during the primary immune response.

Cell Tissue Res. 183, 471-489 (1977).

EWIJK, W. van, VAN DER KWAST, Th. H.:

Migration of B lymphocytes in lymphoid organs of lethally
irradiated thymocyte-reconstituted mice.

Cell Tissue Res. 212, 497-508 (1980).

FORD, W.L.:

Lymphocyte migration and immune responses.

Prog. Allergy 19, 1-59 (1975).

FURTH, R. van:

Cells of the mononuclear phagocyte system. Nomenclature in terms of sites and conditions.

in: Mononuclear Phagocytes Functional Aspects Part I

ed.: FURTH, R. van Martin Nijhoff Publishers

The Hague, Boston, London (1980).

GABBIANI, G., MONTESANO, D.:

Reparative processes in mammalian wound healing: the role of contractile phenomena.

Internat. Rev. Cytol. 45, 167-219 (1977).

GABBIANI, G., CHAPONNIER, Ch., HÜTTNER, I.:

Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing.

J. Cell. Biol. 76, 561-566 (1978).

GALINDO, B., IMAEDA, T.:

Electron microscope study of the white pulp of the mouse spleen.

Anat. Rec. 143, 399-415 (1962).

GANOTE, C.E., ROSENTHAL, A.S., MOSES, H.L., TICE, L.W.:

Lead and phosphate as sources of artifact in nucleoside phosphatase histochemistry.

J. Histochem. Cytochem. 17, 641-650 (1969).

GAUDECKER, B. von, MÜLLER-HERMELINK, H.K.:

The development of the human tonsilla palatina.

Cell Tissue Res. 224, 579-600 (1952).

GEYER, G.:

Ultrahistochemie

Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1973).

GOMORI, G.:

Microscopic histochemistry. Principles and practice.

The University of Chicago Press (1952).

GROBCURTH, P.:

Nonlymphatic cells in the lymph node cortex of the mouse.

I. Morphology and distribution of the interdigitating cells and the dendritic reticular cells in the mesenteric lymph node of adult ICR mouse.

Path. Res. Pract. 169, 212-234 (1980 a).

GROBCURTH, P.:

Nonlymphatic cells in the lymph node cortex of the mouse.

II. Postnatal development of the interdigitating cells and the dendritic reticular cells.

Path. Res. Pract. 169, 235-254 (1980 b).

GUTMAN, G.A., WEISSMAN, I.L.:

Lymphoid tissue architecture: experimental analysis of the origin of T-cells and B-cells.

Immunology 23, 465-479 (1972).

HARDONK, M.J.:

5'-Nucleotidase I. Distribution of 5'-nucleotidase in tissues of rat and mouse.

Histochemie 12, 1-17 (1968).

HARDONK, M.J., HAARSMA, T.J., DIJKHUIS, F.W. POEL, M.,
KOUDESTAAL, J.:

Influence of fixation and buffer treatment on the release of enzymes from the plasma membrane.

Histochemistry 54, 57-66 (1977).

HEPPEL, M.A.:

5'-Nucleotidase

in: The Enzymes, Vol 5, ed. BOYER, P.D., LARDY, H.,
MYRBÄCK, K.; Academic Press, New York and London (1961).

HEUSERMANN, U., ZURBORN, K.-H., SCHROEDER, L., STUTTE, H.J.:

The origin of the dendritic reticulum cell. An experimental, enzyme histochemical and electron microscopic study on the rabbit spleen.

Cell Tissue Res. 209, 279-294 (1980).

HUGON, J., BORGERS, M.:

A direct lead method for the electron microscopic visualization of alkaline phosphatase activity.

J. Histochem. Cytochem. 14, 429-431 (1966).

HUMPHREY, J.H.:

Differentiation of function among antigen-presenting cells.

Ciba Found. Symp. 84, 302-321 (1961).

JÄGER, E.:

Die Gefäßversorgung der malpighischen Körperchen in der Milz.

Z. Zellforsch. 8, 578-601 (1929).

JANOSI, G., TIDMAN, N., SELBY, W.S., THOMAS, J.A.,
GRANGER, S.:

Human T-lymphocytes of inducer and suppressor type occupy different microenvironments.

Nature 288, 81-84 (1980).

KAISERLING, E.:

Non-Hodkin-Lymphome: Ultrastruktur und Cytogenese.

Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York (1977).

KAMPERDIJK, E.W.A., RAAYMAKERS, E.M., DE LEEUW, J.H.S.,
HOEF SMITH, E.C.M.:

Lymph node macrophages and reticulum cells in the immune response. I. The primary response to Paratyphoid Vaccine.

Cell Tissue Res. 192, 1-23 (1978).

KAPINCI, Y., ASSIMACOPOULOS, A., IRLE, C., ZWAHLEN, A.,
GABBIANI, G.:

"Contractile interstitial cells" in pulmonary alveolar septa: a possible regulation of ventilation/perfusion ratio?

J. Cell. Biol. 60, 375-392 (1974).

KARNOVSKY, M.J.:

The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer.

J. Cell. Biol. 35, 213-236 (1967).

KLAUSHOFER, K., BÖCK, P., MÜLLER, M.M.:

Studies on 5'-nucleotidase histochemistry.

1. 5'-Nucleotidase in the developing esophagus of the mouse.
Histochemistry 39, 41-55, 1974.

KLAUSHOFER, K., VON MAYERSBACH, H.:

5'-Nucleotidase in der Rattenleber - Spezifitätsprobleme
und rhythmische Veränderungen.

Acta histochemica Suppl.-Bd. XVIII, 159-168 (1977).

KNYIHAR-CSILLIK, E., CSILLIK, B.:

FRAP: Histochemistry of the primary nociceptive neuron.

Progress in Histochemistry and Cytochemistry 14, Nr. 1
Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York (1981).

KOUVALAINEN, K.:

Species and organ dependence of alkaline phosphatase activity in lymphatic tissues: a histochemical, biochemical and electrophoretic study.

Histochem. J. 3, 55-69 (1971).

KRUMBHAAR, E.B.:

A hematopoietic perifollicular envelope in the rat spleen.
Blood 3, 953-959 (1948).

KUMARARATNE, D.S., BAZIN, H., MAC LENNAN, I.C.M.:

Marginal zones: the major B cell compartment of rat spleens.
Eur. J. Immunol. 11, 858-864 (1981).

LENNERT, K, LÖFFLER, H.:

Fermenthistochemische Untersuchungen an Antikörperbildungs-
stätten.

Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie
115-118 (1962)

Gustav Fischer Verlag Stuttgart

LI, C.Y., YAM, L.T., CROSBY, W.H.:

Histochemical characterization of cellular and structural
elements in the human spleen.

J. Histochem. Cytochem. 20, 1049-1058 (1972).

MAJNO, G., GABBIANI, G., HIRSCHL, B.J., RYAN, G.B.,
STRATKOV, P.R.:

Contraction of granulation tissue in vitro: similarity
to smooth muscle.

Science 173, 546-550 (1971)

MAJNO, G.:

The story of the myofibroblasts.

Am. J. Surg. Pathol. 3, 535-542 (1979).

MANDEL, I.E., PHIPPS, R.P., ABBOT, A., TEW, J.C.:

The follicular dendritic cell: long term antigen retention
during immunity.

Immunological Rev. 53, 29-59 (1960).

MATHIES, J.C.:

Preparation and properties of highly purified alkaline
phosphatase from swine kidneys.

J. Biol. Chem. 233, 1121-1127 (1958).

MAYAHARA, H., HIRANO, H., SAITO, I., OGAWA, K.:

The new lead citrate method for the cytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase).
Histochemie 11, 88-96 (1967).

MC COMB, R.B., BOWERS, G.N., POSEN, S.:

Alkaline Phosphatase

Plenum Press New York and London (1979).

MERKER, H.J., STRUWE, K.:

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Sekretion der bindegewebigen Interzellulärsubstanz.
Z. Zellforsch. 115, 212-225 (1971).

MITCHELL, J.:

Lymphocyte recirculation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell traffic.
Immunology 24, 93-107 (1973).

MIYATA, K., TAKAYA, K.:

Elastic fibers associated with collagenous fibrils surrounded by reticular cells in lymph nodes of the rat as revealed by electron microscopy after orcein staining.
Cell Tissue Res. 220, 445-448 (1981).

MIZUTANI, A.:

Modification of lead method for demonstration of alkaline phosphatase activity with light and electron microscopy.
Acta Tuberc. Jap. 16, 34-38 (1966).

MÜLLER-HERMELINK, K.H.:

Charakterization of the B-cell and T-cell regions of human lymphoid tissue through enzyme histochemical demonstration of ATPase and 5'-nucleotidase activities.

Virchows Arch. B, Cell Path. 16, 371-378, 1974.

MÜLLER-HERMELINK, K.H., HEUSERMANN, U., STUTTE, H.J.:

Enzyme histochemical observations on the localization and structure of the T cell and B cell regions in the human spleen.

Cell Tissue Res. 154, 167-179 (1974).

MÜLLER-HERMELINK, K.H., HEUSERMANN, U., KAISERLING, E., STUTTE, H.J.:

Human lymphatic microecology - specificity, charakterization and ontogeny of different reticulum cells in the B cell and T cell regions.

Adv. Exp. Med. Biol. 66, 177-182 (1976).

MÜLLER-HERMELINK, K.H., LENNERT, K.:

The cytologic, histologic and functional bases for a modern classification of lymphomas.

In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Band 1. Teil B. S. 1-71,

Lubarsch, O., Henke, F. Rössle, R., ed. Uehlinger.

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1978).

MÜLLER-HERMELINK, K.H., VON GAUDECKER, B., DRENCKHAHN, D., JAWORSKY, K., FELDMANN, C.:

Miscellaneous. Fibroblastic and dendritic reticulum cells of lymphoid tissue. Ultrastructural, histochemical and ³H-thymidine labeling studies.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 101, 149-164 (1981).

NOSSAL, G.J.V., ABBOT, A., MITCHELL, J., LUMMUS, Z.:

Antigens in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles.

J. Exp. Med. 127, 277-290 (1968).

NOVIKOFF, A., GOLDFISCHER, S.:

Nucleosidediphosphatase activity in the Golgi-apparatus and it's usefulness for cytological studies.

Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 802-810 (1961).

NOVOTNY-GOMMERT, E.:

Eine Modifikation der Silberimprägnierungstechnik nach Bielschowsky zur Darstellung der reticulären Fasern des Bindegewebes.

Mikroskopie (Wien) 33, 343-352 (1977).

PABST, R., TREPEL, F.:

The predominant role of the spleen in lymphocyte recirculation. I. Homing of lymphocytes to and release from the isolated and perfused pig spleen.

Cell Tiss. Kinet. 8, 529-541 (1975)

PABST, R., BINNS, R.M.:

The three-dimensional reticular structure of the pig spleen demonstrated by labelling with fluoresceiniso-thiocyanate.

Cell Tissue Res. 226, 319-325 (1962).

Parkinson, P.I.:

The effect of graduated exercise on the concentration of adenine nucleotides in plasma.

J. Physiol. Lond. 234, 72-74 (1973).

PEARSE, A.G.E.:

Histochemistry. Theoretical and applied.

Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York (1980).

PEREIRA, G.:

Evidence for a blood - splenic white pulp barrier using a biologically inert electron-opaque tracer.

Scanning Electron Microscopy 11, 649-655 (1978).

PUCHTLER, H., WALDROP, F.S., MELOAN, S., TERRY, M.S.,
CONNER, H.M.:

Methacarn (Methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations.

Histochemie 21, 97-116 (1970).

PUCHTLER, H., WALDROP, F.S., CARTER, M.G., VALENTINE, L.S.:

Investigation of staining, polarization and fluorescence microscopic properties of myoepithelial cells.

Histochemistry 40, 281-289 (1974).

ROMEIS, B.:

Mikroskopische Technik

16. Auflage, R. Oldenbourg Verlag München - Wien (1968)

ROOIJEN, N. VAN:

Mechanism of follicular antigen trapping: Evidence for a two-cell mechanism using double isotope autoradiography.

Immunology 27, 617-622 (1974).

ROOIJEN, N. VAN:

Immune complexes in the spleen. Three concentric follicular areas of immune complex trapping, their inter-relationships and possible function.

J. Reticuloendoth. Soc. 21, 143-150 (1977).

ROOIJEN, N. VAN:

Binding of labelled antigens and immune complexes to macrophages and dendritic cells in cryostat sections of normal mouse spleen.

Acta morphol. Neerl. Scand. 16, 121-127 (1978).

SAITO, H.:

Fine structure of reticular cells in the rat spleen, with special reference to their fibro-muscular features.

Arch. Histol. Jap. 40, 333-345 (1977).

SAITOH, K., KAMIYAMA, R.:

An electron microscopic and enzyme histochemical study of the boundary zone between the white and red pulp of the human spleen.

Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 25, 45-59 (1978).

SAITOH, K., KAMIYAMA, R., HATAKEYAMA, S.:

A scanning electron microscopic study of the boundary zone of the human spleen.

Cell Tissue Res. 222, 655-665 (1982).

SASOU, S., SATODATE, R., KATSURA, S.:

The marginal sinus in the perifollicular region of the rat spleen.

Cell Tissue Res. 172, 195-203 (1976)

SNOOK, Th.:

A comparative study of the vascular arrangements in mammalian spleens.

Am. J. Anat. 87, 31-78 (1950).

SNOOK, Th.:

Studies on the perifollicular region of the rat's spleen.

Anat. Rec. 148, 149-159 (1964).

SOUSA, M. DE:

Reticulum arrangement related to the behaviour of cell populations in the mouse lymph node.

in: Lymphatic tissue and germinal centers in immune response ed. Fiore-Donati, L., Hanna, M.G.

Plenum Press New York (1969).

SOUSA, M. DE:

Kinetics of the distribution of thymus and marrow cells in peripheral lymphoid organs of the mouse : ecotaxis.

Clin. Exp. Immunol. 9, 371-380 (1971).

STADTMAN, Th.C.:

Alkaline phosphatase

in: The Enzymes Vol. 5 ed.: Boyer, P.D., Lardy, H., Myrbäck, K. Academic Press New York and London (1961).

STEIN, H., BONK, A., TOLKSDORF, G., LENNERT, K., RODT, H., GERDES, J.:

Immunhistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue in Non-Hodgkin's lymphomas.

J. Histochem. Cytochem. 28, 746-760 (1980).

STREEFKERK, J.G., VEERMAN, A.J.P.:

Histochemistry and electron microscopy of follicle lining reticular cells in the rat spleen.

Z. Zellforsch. 115, 524-542 (1971).

STUTTE, H.J.:

Hexazotiertes Triamino-tritolyl-methanchlorid (Neufuchsin) als Kupplungssalz in der Fermenthistochemie.

Histochemie 8, 327-331 (1967).

SWARTZENDRUBER, D.C.:

Desmosomes in germinal centers of mouse spleen.

Exp. Cell Res. 40, 429-432 (1965).

SZAKAL, A.K., HANNA, M.G.:

The ultrastructure of antigen localization and virus-like particles in mouse spleen germinal centers.

Exp. Molec. Pathol. 8, 75-89 (1968).

TAKASAKI, S.:

Light microscopic, scanning and transmission electron microscopic and enzyme histochemical observations on the boundary zone between the red pulp and white pulp and its surroundings in human spleen.

Tokyo Jikeikai Med. J. 94, 553-568 (1979).

TRANZER, J.P.:

Nouvelle méthode de mis en évidence de la phosphatase alcaline au microscope électronique.

Electron Microscopy Vol. II, ed. Ryozi Uyeda, Maruzen (1966).

UUSITALO, R., KARNOVSKY, M.J.:

5'-Nucleotidase in different populations of mouse lymphocytes.

J. Histochem. Cytochem. 25, 97-103 (1977 a).

UUSITALO, R., KARNOVSKY, M.J.:

Surface localization of 5'-nucleotidase on the mouse lymphocyte.

J. Histochem. Cytochem. 25, 87-96 (1977 b).

VEERMAN, A.J.P., VAN EWIJK, W.:

White pulp compartments in the spleen of rats and mice.

Cell Tissue Res. 156, 417-441 (1975).

VEERMAN, A.J.P., VAN ROOIJEN, N.:

Lymphocyte capping and lymphocyte migration as associated events in the in vivo antigen trapping process. An electron microscopic autoradiographic study in the spleen of mice.

Cell Tissue Res. 161, 211-217 (1975)

VEERMAN, A.J.P., DE VRIES, H.D.:

T- and B- areas in immune reactions. Volume changes in T and B cell compartments of the rat spleen following intravenous administration of a thymus dependent (SRBC) and a thymus independent (paratyphoid-vaccine-endotoxin) antigen. A histometric study.

Z. Immunitätsforsch. 151, 202-218 (1976).

Veldman, J.E.:

Histophysiology and electron microscopy of the immune response.

Thesis, Groningen, Drukkerij Dijkstra-Niemeyer (1970).

WACHSTEIN, M., MEISEL, E.:

Histochemistry of hepatic phosphatases at physiologic pH.

Amer. J. Clin. Path. 27, 13-23 (1957).

WATSON, M.L.:

Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.

J. biophys. biochem. Cytol. 4, 475-478 (1958).

WEIDENREICH, F.:

Das Gefäßsystem der menschlichen Milz.

Arch. f. Mikr. Anat. 58, 247-376 (1901).

WEISS, L.:

The white pulp of the spleen. The relationships of arterial vessels, reticulum and free cells in the periarterial lymphatic sheath.

Bull. of the John Hopkins Hosp. 115, 99-173 (1964).

WEISS, L.:

The cells and tissues of the immune system.

Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs N.J., Chap. 5 (1972).

WEISS, L.:

The development of the primary vascular reticulum in the spleen of human fetuses (38 to 57 mm crown-rump length).

Am. J. Anat. 136, 315-337 (1973).

WEISS, L., CHEN, L.:

The differentiation of white pulp and red pulp in the spleen of human fetuses of 72-145 mm crown-rump length.

Am. J. Anat. 141, 393-414 (1974).

WHITE, R.G.:

Functional recognition of immunologically competent cells by means of the fluorescent antibody technique.

in: Ciba Foundation Study Group No. 16, 6-20. The immunologically competent cell: Its nature and origin.

ed. G.E.W. Wolstenholme and Knight London: Churchill (1963).

YAMASHINA, S., KAWAI, K.:

Localization of 5'-nucleotidase activity in the parotid acinar cells of a rat treated with Isoproterenol.

Cell Tissue Res. 214, 483-490 (1981).

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. J. Schlüns ganz herzlich für die Überlassung des Themas sowie für sein ständiges Interesse am Verlauf der Arbeit und die jederzeit gewährte wissenschaftliche Beratung danken.

Frau B. Drewes danke ich herzlich für die Unterstützung und Beratung bei labortechnischen Arbeiten.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere für die Unterstützung durch Herrn H. Rother bei elektronenmikroskopischen, Frau C. Rückauer und Frau D. Schürmann bei fotografischen und Herrn H. Driesener bei präparatorischen Arbeiten.

Lebenslauf

Name: Rühl

Vorname: Christine, Irmgard

Geburtsdatum: 1.1.1956

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung: 1962-1968 Grundschule
1968-1974 Gymnasium
Dezember 1974 Abitur

Studium: 1975-1980 Veterinärmedizin an
der Freien Universität Berlin
Juli 1980 Staatsexamen

Approbation: 20. Oktober 1980

Berufstätigkeit: Oktober 1980 bis Oktober 1981
wissenschaftliche Mitarbeiterin
am Institut für Veterinär-Ana-
tomie, -Histologie und -Embryo-
logie der Freien Universität
Berlin.
November 1981 bis Februar 1982
Lehrauftrag für die anatomischen
Präparierübungen.

